



COMPENDIO 2022

# La ricerca sulla sclerosi multipla

## Research on multiple sclerosis

---

**Finanziata dalla Fondazione  
Italiana Sclerosi Multipla**  
Funded by the Italian Multiple  
Sclerosis Foundation

**SCLE  
ROSI  
MULT  
IPLA**  
associazione  
italiana

un mondo  
libero dalla SM

AI SM. INSIEME, UNA CONQUISTA DOPO L'ALTRA

# **La ricerca sulla sclerosi multipla**

Research on  
multiple sclerosis

---

**Finanziata dalla Fondazione Italiana  
Sclerosi Multipla**

*Funded by the Italian Multiple Sclerosis  
Foundation*

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - APS

A cura di:

**Roberta Guglielmino**

Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Progetto e coordinamento editoriale:

**Manuela Capelli**

Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Copyright FISM 2022

Pubblicato e distribuito da:

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - APS

Via Operai, 40 - 16149 Genova

Tutti i diritti sono riservati.

È vietata la riproduzione con qualsiasi mezzo, anche se parziale,  
senza il permesso scritto dell'editore.

Progetto grafico e impaginazione:

**Alba Bertolini**

Finito di stampare nel mese di maggio 2022

da Ditta Lang Srl - Genova

ISBN 978-88-7148-149-4

# Introduzione / Introduction

---

**L**a nostra migliore ricerca di oggi è la cura di domani. Questa è la scienza che conosciamo, quella che ci ha visto *connessi* verso la promozione di un sistema unico fra ricerca e cura. La ricerca scientifica cui diamo vita, tiene insieme sogni e concretezza. Senza questa connessione profonda e reale non troveremmo le risposte che servono alla vita delle persone con sclerosi multipla e altre malattie neurodegenerative. Ma la nostra passione non basta: dobbiamo ascoltare i bisogni delle persone; è fondamentale monitorare l'impatto della nostra ricerca sulla loro vita reale. Miriamo a far sentire le persone connesse in modo che nessuno si senta solo o trascurato nella propria condizione di sfida: la nostra priorità deve essere la vita quotidiana e il benessere delle persone.

Per questo abbiamo intitolato "Connecting MS" i Congressi FISM e le Giornate Mondiali della SM negli ultimi anni e anche nel 2022: ci sentiamo e siamo committed, corresponsabili dell'impatto della ricerca sulle persone e sulla società. E siamo, per questo motivo, *connessi* nella costruzione di "partnership" innovative, supportate dagli obiettivi di sviluppo sostenibile sociale (SDG) dell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite.

Solo una ricerca partecipata e responsabile permette al nostro impegno di costruire una società inclusiva in cui tutti abbiano il diritto di vivere fino in fondo la propria vita.

Una partnership, una connessione solida di cui questo Compendio è testimonianza è certamente quella che la comunità scientifica, nazionale e internazionale, e la nostra Fondazione hanno stabilito da lungo tempo: è significativo che i progetti qui presentati coinvolgano ben otto ricercatori e ricercatrici che, a partire dal 1999, hanno vinto il Premio Rita Levi Montalcini istituito da FISM. Un indicatore di come il seme della ricerca promossa, sostenuta e indirizzata da FISM continui a germogliare con abbondanza di frutti e non smetta di costruire le risposte che cambiano la vita di tante persone con SM e di altre che si trovano ad affrontare malattie neurodegenerative.

Una chiara connessione tra ricerca sulla SM e patologie correlate emerge dagli studi qui presentati sulla *neuroriabilitazione*, eccellenza scientifica e concretezza di impatto già oggi nella vita delle persone, come anche negli studi su *patogenesi* e *fattori di rischio*, che continuano a rendere solida quella conoscenza che consentirà, un giorno, di considerare 'guaribile' una volta per tutte la sclerosi multipla.

Nel frattempo, prosegue con documentato successo l'intenso percorso dei progetti che stanno individuando strade *verso nuovi trattamenti*, così come significativi sono gli esiti dei progetti mirati a individuare i meccanismi di progressione e trattamenti in grado di riparare il danno nelle forme più impegnative di sclerosi multipla progressiva.

Analogo percorso di connessione ampia si ritrova anche nei progetti dedicati al *monitoraggio*, alla *diagnosi*, all'individuazione di quei fattori prognostici che consentono sempre di più una precisa medicina personalizzata.

L'Agenda della Sclerosi Multipla e patologie correlate 2025 alla voce diritto alla ricerca è stata co-promossa dalle persone con SM, caregiver e ricercatori, come stakeholder chiave del diritto alla ricerca.

È un'agenda di priorità concrete per la cui realizzazione siamo tutti *connessi*, tutti corresponsabili.

L'abbiamo scritta insieme, chiederemo a tutti gli attori che condividono la missione Diritto alla Ricerca e l'Agenda 2025, di esserne co-responsabili per una ricerca scientifica rigorosa, di eccellenza ed innovativa che si trasforma in una cura con e della persona.

**Mario Alberto Battaglia**

Presidente FISM

**Paola Zarin**

Direttore Ricerca Scientifica FISM

**T**oday's research bring hope for the cure of tomorrow. The research we carry on is the science that we know. The science that connected us towards the promotion of a unique ecosystem between research and cure. FISM scientific research aims far in ambitions and performs concretely in actions. We strongly believe that this aspiration to connect dreams and realism is the key to find answers for people with MS and related disorders.

We acknowledge that our enthusiasm is not sufficient thou. In order to steer our research at best, we are compelled to listen to people needs; it is fundamental to monitor the impact of our research on their real lives. We aim to make people feel connected so that no one feels alone or neglected in her own challenging condition: our priority must be people daily lives and wellness.

FISM Congress and of the World MS Days title in the last years and in 2022 is "Connecting with MS"; it wants to mirror our full commitment as well as co-responsibility with respect to the impact of research on people with MS and on society.

With this goal in mind, FISM is actively seeking the construction of innovative partnerships promoting the Sustainable social Developments Goals (SDG) of the United Nations 2030 Agenda.

A responsible and participatory research is a unique mean to build an inclusive society where everyone has the right to live at his full potential.

Compendium is the proof of the solid connection, and partnership, that our Foundation has established with the national and international scientific community for a long time. The projects here presented involve eight researchers who won the Rita Levi Montalcini Prize awarded by FISM, from 1999. This is a considerable signal of how FISM has been, and still is, able to promote support and direct promising seeds and new paths for research.

Also, it doesn't stop giving life-changing answers to many people with MS and to those who have to face other neurodegenerative disorders.

A clear connection of research on MS and related disorders comes from the studies on neurorehabilitation here presented. These already merge scientific excellence and concreteness of impact in lives of people with MS and that, together with the studies on pathogenesis and risk factors, which continue to produce solid further knowledge that, may allow one day to consider MS finally curable.

Along with the mentioned examples, it is fundamental to acknowledge the success of the projects dedicated to identifying ways towards new treatments, as well as those aimed at identifying the progression mechanisms and treatments capable of healing or relieving the most difficult or demanding forms of progressive MS.

The deep overall connection of our research can be retrieved also in the analysis of the projects dedicated to monitoring, to diagnosis, and to the identification of those prognostic factors that increasingly bring us closer to a precise and personalized medicine.

The concept of "Right to research", presented in the 2025 Multiple Sclerosis and related disorders Agenda, has been co-promoted and co-validated by people with MS, caregivers and researchers, as key stakeholders of the right to research. Our Agenda promotes concrete priorities, which realization demands our overall connection and co-responsibility.

We planned the Agenda together. We are confident that all the actors who embrace right to research as a mission and the other goals of Agenda 2025 will accept to be co-responsible for a meticulous, excellent and innovative scientific research, which can translate into a cure with and for the person.

**Mario Alberto Battaglia**

Chairman of the Italian  
Multiple Sclerosis Foundation

**Paola Zaratini**

Director of Scientific Research for the  
Italian Multiple Sclerosis Foundation

## Lista degli autori / List of Authors

---

Abracchio Maria Pia	144	Huang Su-Chun	66
Amato Maria Pia	130, 182	Ietta Francesca	103
Baldini Sara	69	Laroni Alice	28
Bandiera Paolo	140	Lorefice Lorena	191
Battistini Luca	162	Martino Gianvito	87, 151
Bergamaschi Roberto	73, 189	Marzola Pasquina	64
Bertolotto Antonio	147	Matarese Giuseppe	162
Boda Enrica	23	Pantano Patrizia	218
Bozzoli Federico	118	Patti Francesco	194
Brichetto Giampaolo	127	Pau Massimiliano	83
Casadio Maura	80	Pedullà Ludovico	118
Cattaneo Davide	76	Piccio Laura	37
Centonze Diego	133	Ponzio Michela	137
Comoglio Paolo	92	Preziosa Paolo	57
Costanza Massimo	112	Pugliatti Maura	20
Cucca Francesco	155, 158	Ria Francesco	95
D'Amico Emanuele	198, 201	Ristori Giovanni	166
De Stefano Nicola	216	Rocca Maria	53
Decimo Ilaria	106	Santillo Mariarosaria	45
Eberini Ivano	144	Santoni de Sio Francesca	31
Eva Esposito Federica	173	Storelli Loredana	61
Filippi Massimo	49, 213	Tedeschi Gioachino	220
Furlan Roberto	90	Tosti Valeria	41
Geginat Jens	34	Trojano Maria	185
Ghezzi Angelo	16	Ulivelli Monica	179
Gilli Francesca	26	Verderio Claudia	99
Giovannetti Ambra Mara	122	Zenaro Elena	109

# Indice / Index

---

<b>INTRODUZIONE / INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
Mario A. Battaglia Paola Zarin	
<b>LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF AUTHORS</b>	<b>6</b>
<b>PROGETTI BANDO FISM TERMINATI NEL 2021</b> FISM CALL PROJECTS ENDED IN 2021	<b>14</b>
<b>PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS</b>	<b>15</b>
<b>Angelo Ghezzi</b>	<b>16</b>
<b>Analisi di fattori di rischio genetici e dell'interazione gene-ambiente nella sclerosi multipla pediatrica (PEDiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) (studio PEDIGREE)</b> Identification of genetic risk factors and interaction between genetic and non-genetic risk factors in pediatric multiple sclerosis (PEDiatric Italian Genetic and environment ExposurE) (PEDIGREE study)	
<b>Maura Pugliatti</b>	<b>20</b>
<b>Sviluppo di uno strumento per identificare il ruolo prognostico di fattori di rischio ambientale modificabili sul decorso della sclerosi multipla nel contesto di ricerca internazionale (EnvIMULTIPLE SCLEROSIS-Pro-Q)</b> Developing a tool for investigating the prognostic role of modifiable environmental risk factors in multiple sclerosis disease course in multinational research (EnvIMULTIPLE SCLEROSIS-Pro-Q)	
<b>Enrica Boda</b>	<b>23</b>
<b>Inquinamento dell'aria e sclerosi multipla: ruolo dell'esposizione al particolato (PM) e del traffico di vescicole extracellulari associato nella neuroinfiammazione e demielinizzazione</b> Air pollution and multiple sclerosis: role of particulate matter (PM) exposure and associated extracellular vesicle trafficking in neuroinflammation and demyelination	
<b>Francesca Gilli</b>	<b>26</b>
<b>Effetti del sesso biologico sull'attività immunitaria umorale intratecale e la progressione di malattia nella sclerosi multipla</b> Sex effects on intrathecal humoral inflammation and disease progression in multiple sclerosis	
<b>Alice Laroni</b>	<b>28</b>
<b>Effetto dei cambiamenti metabolici, indotti da un'associazione di probiotici e prebiotici e mediati dal microbiota, sulla modulazione delle risposte immuni nella sclerosi multipla</b> Impact of prebiotic/probiotic-mediated changes in microbe-derived metabolites on dysfunctional innate immune responses in multiple sclerosis	
<b>Francesca Santoni de Sio</b>	<b>31</b>
<b>Studio del ruolo dei nodi epigenetici aberranti nella deregolazione immunologica delle cellule T CD4+ nella sclerosi multipla</b> Unraveling the role of aberrant epigenetic hubs in the pathogenic dysregulation of CD4+ T cells in Multiple Sclerosis	
<b>Jens Geginat</b>	<b>34</b>
<b>Proprietà soppressive delle cellule regolatorie di tipo 1 in risposta a cellule T patogene nella sclerosi multipla</b> Suppression of pathogenic T-cell responses by type 1 regulatory-like T-cells in multiple sclerosis	
<b>Laura Piccio</b>	<b>37</b>
<b>Ruolo di TREM2 nella modulazione della microglia durante demielinizzazione nel sistema nervoso centrale</b> Role of TREM2 in modulating microglia function during CNS demyelination	

<b>Valeria Tosti, Laura Ghezzi</b>	<b>41</b>
<b>Impatto di digiuno a giorni alterni in un modello murino di sclerosi multipla</b> Impact of Intermittent Fasting on a mouse model of multiple sclerosis	
<b>Mariarosaria Santillo</b>	<b>45</b>
<b>Anticorpi patogenetici diretti contro le cellule che formano mielina in pazienti affetti da sclerosi multipla</b> Multiple sclerosis pathogenic antibodies targeting myelin forming cells in multiple sclerosis patients	
<b>DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA</b>	<b>48</b>
<b>DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE</b>	
<b>Massimo Filippi</b>	<b>49</b>
<b>Il ruolo della connettività cerebrale e di tecniche di machine learning per la predizione del peggioramento clinico e della compromissione cognitiva in pazienti con sclerosi multipla</b> The role of brain network connectivity and machine learning for predicting disease worsening and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis	
<b>Maria A. Rocca</b>	<b>53</b>
<b>Valutazione dell'atrofia della sostanza bianca nella sclerosi multipla: assottigliamento dei fasci di fibre e perdita assonale</b> Assessment of white matter atrophy in multiple sclerosis: fibre bundle shrinkage and microstructural axonal loss	
<b>Paolo Preziosa</b>	<b>57</b>
<b>Il ruolo del NODDI per migliorare la definizione delle alterazioni microstrutturali della sostanza grigia nella SCLEROSI MULTIPLA: relazione con la disabilità clinica e la compromissione cognitiva</b> The role of NODDI to disentangle gray matter neuroanatomical microstructural abnormalities in multiple sclerosis: relation with clinical disability and cognitive impairment	
<b>Loredana Storelli</b>	<b>61</b>
<b>Predizione della progressione di malattia nei pazienti con sclerosi multipla tramite modelli di intelligenza artificiale applicati a immagini di risonanza magnetica</b> A deep-learning approach to predict disease progression in multiple sclerosis using magnetic resonance imaging	
<b>Pasquina Marzola</b>	<b>64</b>
<b>Validazione dell' imaging funzionale come biomaker innovativo della progressione della patologia in un modello sperimentale di sclerosi multipla</b> Validation of rsfMRI as innovative biomarker for disease progression in a experimental model of multiple sclerosis	
<b>Su-Chun Huang</b>	<b>66</b>
<b>Combinando Morfometria basata sui Voxel della Tomografia a Coerenza Ottica e Potenziale Evocato Visivamente Multifocale per studiare demielinizzazione e neurodegenerazione della sclerosi multipla</b> Combining Voxel-Based Morphometry of Optical Coherence Tomography and Multifocal Visual Evoked Potential to study the relationship between demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis	
<b>Sara Baldini</b>	<b>69</b>
<b>Il contributo della riserva cognitiva nei pazienti con sclerosi multipla: uno studio di EEG ad alta densità</b> Investigating relationships between high density-electroencephalography microstates and reserve in patients with multiple sclerosis	
<b>NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA</b>	<b>72</b>
<b>NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE</b>	
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<b>73</b>
<b>Costi della comorbidità in persone con sclerosi multipla</b> Costs of comorbidity in people with multiple sclerosis	



<b>Davide Cattaneo</b>	<b>76</b>
<b>Identificazione dei disturbi precoci del cammino in persone non disabili affetti da SM: valutazione clinico-strumentale della progressione della malattia e di potenziali interventi terapeutici</b>	
Unraveling early walking dysfunction in non-disabled MS people: clinical and instrumental assessment of disease progression and potential therapeutic interventions	
<b>Maura Casadio</b>	<b>80</b>
<b>Metodi avanzati di analisi video per la diagnosi precoce, la valutazione quantitativa e il monitoraggio di deficit motori in persone con sclerosi multipla</b>	
Advanced video analysis to detect, measure and monitor motor deficits in people with multiple sclerosis	
<b>Massimiliano Pau</b>	<b>83</b>
<b>Soluzioni innovative a basso costo basate su realtà virtuale per la riabilitazione domiciliare dell'arto superiore nella sclerosi multipla</b>	
Innovative low-cost solutions for upper limb home-based rehabilitation in multiple sclerosis	
<b>VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS</b>	<b>86</b>
<b>Gianvito Martino</b>	<b>87</b>
<b>Strategia di trapianto di cellule staminali neurali ingegnerizzate per promuovere la remielinizzazione e la neuroprotezione nella sclerosi multipla</b>	
Multi fold transplant strategy of engineered neural stem cells to promote remyelination and neuroprotection in multiple sclerosis	
<b>Linda Ottoboni, Roberto Furlan</b>	<b>90</b>
<b>Analisi dei trascritti contenuti nelle singole microvescicole rilasciate dalla microglia ottenuta da cellule pluripotenti umane indotte</b>	
Single extra-micro-cellular vesicle sequencing analysis from human induced pluripotent stem cell derived microglia	
<b>Paolo Comoglio</b>	<b>92</b>
<b>Attivazione del recettore Met come strumento terapeutico nella sclerosi multipla: un nuovo meccanismo di neuroprotezione che coinvolge il sistema glutammatergico</b>	
Activation of the Met receptor as therapeutic tool in MS: a new neuroprotective mechanism involving the glutamatergic system	
<b>Francesco Ria</b>	<b>95</b>
<b>Liposomi "janus-faced" come strumenti terapeutici in grado di mediare un fenotipo T soppressorio nella sclerosi multipla</b>	
Janus-faced liposomes as therapeutic tools to drive T suppressor phenotype in multiple sclerosis	
<b>Claudia Verderio</b>	<b>99</b>
<b>Vescicole extracellulari di origine mieloide nel sangue: una finestra sulle disfunzioni sinaptiche e un possibile bersaglio per una nuova terapia epigenetica nella SM</b>	
Circulating extracellular vesicles derived by myeloid cells: a window on synaptic dysfunction and a target for novel epigenetic intervention in MS	
<b>Francesca Ietta</b>	<b>103</b>
<b>Il ruolo della placenta sull'asse RANK-RANKL-OPG nella sclerosi multipla: uno studio pilota</b>	
The role of the placenta on the RANK-RANKL-OPG axis in multiple sclerosis: a pilot study	
<b>Ilaria Decimo</b>	<b>106</b>
<b>Il ruolo dei progenitori neurali delle meningi nella regolazione delle cellule autoimmuni del cervello</b>	
The role of meningeal neural progenitor cells in brain auto-reactive immune cell regulation	
<b>Elena Zenaro</b>	<b>109</b>
<b>Caratterizzazione delle interazioni neutrofilo-astrocita nella encefalomielite sperimentale autoimmune</b>	
Characterization of neutrophil-astrocyte interplay in experimental autoimmune encephalomyelitis	
<b>Massimo Costanza</b>	<b>112</b>
<b>Il ruolo del DNA extracellulare rilasciato dai linfociti T helper (THREDs) nell'infiammazione autoimmune e nella neurodegenerazione del sistema nervoso centrale</b>	
The role of T-helper-released extracellular DNAs (THREDs) in autoimmune inflammation and neurodegeneration of the central nervous system	

## PROGETTI SPECIALI / SPECIAL PROJECTS 115

**Introduzione / Introduction 116**

## MEDICINA PERSONALIZZATA / PERSONALIZED MEDICINE 117

**Federico Bozzoli, Ludovico Pedullà 118**

**MyMood: sviluppo di nuovi patient-reported outcomes sui disturbi dell'umore nella SM.**

**Un approccio di co-creazione tramite scienza basata sull'input del e con il paziente**

MyMood: developing new patient-reported outcomes on mood disorders in MS.

An approach of co-creation through science of and with patient input

**Ambra Mara Giovannetti 122**

**Allestimento italiano del programma "REsilience and Activity every DaY for MS",**

**degli outcomes, e valutazione pilota di efficacia mediante impiego di metodologia mista (READY- It-MS)**

Italian set up of the program "REsilience and Activity every DaY for MS", of outcomes,

and pilot assessment of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)

**Giampaolo Bricchetto 127**

**Un nuovo profilo funzionale per monitorare la progressione della disabilità nella sclerosi multipla (PROMOPRO-MS)**

A new functional profile to monitor the progression of disability in multiple sclerosis PROMOPRO-MS

**Maria Pia Amato 130**

**Riabilitazione cognitiva dell'attenzione, a domicilio con l'uso del computer, in soggetti con sclerosi multipla ad esordio pediatrico: uno studio pilota multicentrico**

Home-based, computer-assisted cognitive rehabilitation for attention in pediatric onset multiple sclerosis:

a pilot multicenter study

**Diego Centonze 133**

**La sinaptopatia infiammatoria come bersaglio dell'esercizio terapeutico nella lotta alla sclerosi multipla**

The inflammatory synaptopathy as a target of exercise therapy in the fight against multiple sclerosis

**Michela Ponzio 137**

**Studio di ricerca sulla percezione di competenza delle persone che si prendono cura o assistono un familiare con la sclerosi multipla**

A study of the sense of competence in family caregivers of people with multiple sclerosis

**Paolo Bandiera 140**

**Il PDTA come strumento di umanizzazione e personalizzazione dei percorsi di cura e assistenziali presso la Rete della SM**

Care Pathway as a tool towards humanization and personalization of care in MS

## SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS 143

**Maria Pia Abbracchio, Ivano Eberini 144**

**Sviluppo di un brevetto su nuovi modulatori di GPR17, un recettore chiave nei processi di rimielinizzazione**

Patent development of new modulators of GPR17, a key receptor in remyelinating processes

**Antonio Bertolotto 147**

**Una biobanca ed un laboratorio dedicati alla raccolta ed alla distribuzione di campioni biologici di SM, alla replicazione e condivisione di dati e alla validazione di metodi biologici**

A bio-bank and a laboratory dedicated to collection and supply of biological samples of MS, for replication and sharing of data, as well as validation of biological methods

**Gianvito Martino 151**

**Trapianto di cellule staminali neurali in pazienti con sclerosi multipla: uno studio di fase I**

Neural stem cells transplantation in multiple sclerosis patients: a phase I study

## **VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS** 154

**Francesco Cucca** 155

**Un approccio basato sulla genetica per identificare farmaci per la sclerosi multipla: sviluppo di brevetti dei geni candidati**

A genetic toolbox in MS drug discovery; patent development of candidate genes

**Francesco Cucca** 158

**Impatto dei fattori genetici e dei farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla sulle risposte immunitarie cellulari e umorali dopo la vaccinazione contro Sars-Cov-2: studio pilota in Sardegna**

Impact of genetic factors and drugs used in the treatment of multiple sclerosis on cellular and humoral immune responses after vaccination against Sars-Cov-2: a pilot study in Sardinia

**Giuseppe Matarese, Luca Battistini** 162

**Restrizione calorica come nuovo approccio terapeutico per manipolare l'immunità e per migliorare il potenziale terapeutico di farmaci di prima linea nella sclerosi multipla recidivante remittente**

Caloric restriction as a novel therapeutic tool to manipulate immunity and improve therapeutic potential of first line drug treatments during relapsing remitting multiple sclerosis

**Giovanni Ristori** 166

**Vaccino con bacillo di Calmette-Guérin nella sindrome radiologicamente isolata**

Bacille Calmette Guerin vaccine in radiologically isolated syndrome

**Monica Ulivelli** 169

**Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasmissibili, prevenibili da vaccino, e sicurezza dei vaccini, in una coorte di pazienti con sclerosi multipla. Studio multicentrico italiano**

Immunisation status against major communicable diseases preventable with vaccines, and safety of vaccines, in a cohort of multiple sclerosis patients. An Italian multicenter study

**Federica Eva Esposito** 173

**Validazione e studio funzionale di varianti genetiche implicate nella risposta alla terapia con fingolimod**

Validation and functional assessment of genetic variants implicated in the response to fingolimod treatment

## **DATA SHARING / DATA SHARING** 176

**REGISTRO ITALIANO SCLEROSI MULTIPLA E PATOLOGIE CORRELATE** 177

MULTIPLE SCLEROSIS ITALIAN REGISTER AND RELATED DISORDERS

**Indice / Index** 178

**Introduzione / Introduction** 180

**Epidemiologia Descrittiva / Descriptive Epidemiology** 182

**Maria Pia Amato** 182

**Progressione silente in una coorte Italiana di pazienti con CIS e SM recidivante-remittente**

Silent progression in an Italian cohort of CIS and Relapsing-Remitting MS patients

**Maria Trojano** 185

**Fattori demografici, clinici e terapeutici associati al rischio e alla severità di Covid-19 in persone con sclerosi multipla**

Demographic, clinical and treatment factors associated with the risk and severity of Covid-19 in people with multiple sclerosis

**Roberto Bergamaschi** 189

**Studio ETEROGENEITÀ. L'espressione fenotipica della sclerosi multipla (SM) può essere condizionata dalle caratteristiche del centro SM di riferimento?**

HETEROGENEITY Study. Are multiple sclerosis (MS) phenotypes influenced by the type of referral MS center?

<b>Lorena Lorefice</b>	<b>191</b>
<b>Caratterizzazione clinica ed evoluzione della Sclerosi Multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo</b>	
Clinical characteristics and disease outcomes of late onset Multiple Sclerosis: a retrospective multicenter study	
<b>Ottimizzazione delle terapie / Therapy optimization</b>	<b>194</b>
<b>Francesco Patti</b>	<b>194</b>
<b>Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real word life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano</b>	
Clinical effectiveness of different Natalizumab interval dosing schedules in a large italian population of patients with multiple sclerosis	
<b>Emanuele D'Amico</b>	<b>198</b>
<b>Il fenotipo e il recupero delle ricadute nei pazienti con Sclerosi Multipla Recidivante Remittente: vecchie e nuove terapie modificanti il decorso a confronto</b>	
First relapse phenotype and recovery in naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients undergoing old and new disease modifying therapies: an Italian Registry study	
<b>Emanuele D'Amico</b>	<b>201</b>
<b>Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico</b>	
Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study	
<b>Progetti approvati Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate</b>	<b>204</b>
Multiple Sclerosis Italian Register and related disorders approved projects	
<b>Comitato Scientifico del Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate</b>	<b>208</b>
Italian MS Registry and related disorders Scientific Committee	
<b>NETWORK ITALIANO DI NEUROIMAGING (INNI)</b>	<b>209</b>
<b>PER L'OTTIMIZZAZIONE DELL'UTILIZZO DI TECNICHE AVANZATE DI RISONANZA MAGNETICA IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA</b>	
THE ITALIAN NEUROIMAGING NETWORK INITIATIVE (INNI) TO OPTIMIZE THE USE OF ADVANCED MRI TECHNIQUES IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS	
<b>Massimo Filippi</b>	<b>213</b>
<b>Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica</b>	
Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice	
<b>Nicola De Stefano</b>	<b>216</b>
<b>Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con sclerosi multipla</b>	
Large-scale, multi-centre assessment of hippocampal volume in MS patients	
<b>Patrizia Pantano</b>	<b>218</b>
<b>L'impatto dei cambiamenti della connettività funzionale sulla progressione della malattia e l'accumulo di disabilità</b>	
The impact of functional connectivity changes on disease progression and disability accumulation	
<b>Gioachino Tedeschi</b>	<b>220</b>
<b>Determinanti RM strutturali e funzionali di disequilibrio cognitivo-radiologico in pazienti con SM</b>	
Structural and functional MRI determinants of cognitive-radiological mismatch in MS patients	

<b>PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM</b> FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2021, 2020	<b>225</b>
<b>Comitato scientifico FISM / FISM Scientific Committee</b> 2021, 2020	<b>231</b>



**PROGETTI BANDO FISM  
TERMINATI NEL 2019**

FISM CALL PROJECTS  
ENDED IN 2019

---

---

# **Patogenesi e fattori di rischio**

Pathogenesis  
and risk factors

---

# Analisi di fattori di rischio genetici e dell'interazione gene-ambiente nella sclerosi multipla pediatrica (PEDIatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) (PEDIGREE study)

## Angelo Ghezzi

*Centro Studi Sclerosi Multipla, Ospedale di Gallarate, ASST Valle Olona, Gallarate, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Maria Pia Amato, Roberto Bergamaschi, Eleonora Cocco, Sandra D'Alfonso, Filippo Martinelli Boneschi, Maura Pugliatti, Maria Trojano**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHERS GROUPS

**Elonora Cocco, Gabriella Spinicci, Maria Fronza, Maria Rita Murru, Valentina Fadda, Centro SM, Cagliari, Italia**

**Giuseppe Santangelo, Antonio Marino, Andrea Santangelo, NPI A.R.N.A.S. Civico di C. Benfratelli, Palermo, Italia**

**Ruggero Capra, Sarah Rasia, Centro SM Montichiari, Brescia, Italia**

**Lucia Moiola, Chiara Zanetta, Federica, Esposito, Massimo Filippi, HSR, San Raffaele, Milano**

**Vincenzo Brescia Morra, Roberta Lanzillo, Università Federico II, Napoli, Italia**

**Antonio Bertolotto, Martina Borghi, CreSM, Orbassano-TO, Italia**

**Gioacchino Tedeschi, Antonio Gallo, Alvino Bisecco, Centro SM, I Clinica Neurologica, Università degli Studi della Campania "L. Vanvitelli", Napoli, Italia**

**Roberto Bergamaschi, Sara Fusco, IRCCS Fondazione Mondino, Pavia, Italia**

**Mauro Zaffaroni, Damiano Baroncini, Francesca Sassi, Ospedale di Gallarate ASST Valle Olona, Gallarate, Italia**

**Agnese Supppei, NPI, Università degli Studi of Ferrara, Ferrara, Italia**

**Alessandra Tozzo, Valentina Torri Clerici, Istituto Neurologico Besta, Milano, Italia**

**Alessandra Protti, Lorenzo Saraceno, Centro SM, S.C. Neurologia e Stroke Unit, Ospedale Niguarda, Italia**

**Carlo Pozzilli, Viola Baione, Giorgia D'Ambrosi, Azienda Ospedaliera Universitaria, S. Andrea, Roma, Italia**

**Stefano Sotgiu, Alessandra Carta, NPI, AOU Sassari, Italia**

**Marta Zaffira Conti, Marta Radaelli, Neurologia, Ospedale di Bergamo, Bergamo Italia**

**Maurizio Viri, Amanda Papa, Fabio Brustia, Neuropsichiatria Infantile, Ospedale Maggiore, Novara, Italia**

**Roberto Cantello, Domizia Vecchio, Neurologia, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italia**

**Pierangelo Veggiotti, Stefania Maria Bova, Ylenia Vaia, Eleonora Basso, Ospedale dei Bambini V. Buzzi, Milano, Italia**

**Giovanna De Luca, Valentina Tomassini, Clinica Neurologica, Chieti, Italia**

**Maria Trojano, Marta Simone, Candida Fasano, Clinica Neurologica, Bari, Italia**



**Maria Pia Amato, Emilio Portaccio, Angelo Bellinva**, *Clinica Neurologica, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia*

**Luigi Maria Edoardo Grimaldi, Oscar Oddo**, *Fondazione Istituto G. Giglio, Pisciotto, Cefalù (Palermo), Italia*

**Francesco Patti, Maria Luca**, *Centro SM Policlinico G. Rodolico - San Marco, Università di Catania, Catania, Italia*

**Giacomo Lus, Marcella Coletta**, *Centro SM, II Università di Napoli, Napoli Italia*

**Carlotta Canavese**, *NPI, Torino, Italia*

**Angela Berardinelli, Stefano Parravicini**, *NPI IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino Pavia, Italia*

**Girolama Alessandra Marfia, Carolina Gabri Nicoletti, Doriana Landi**, *UOSD Sclerosi Multipla, Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia*

**Girolama Marfia**, *Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia*

**Salvatore Cottone**, *Neurologia, A.R.N.A.S. Civico di C. Benfratelli, Palermo*

**Maura Pugliatti, Silvy Pilotto**, *Università degli Studi di Ferrara, Clinica Neurologica, Ferrara Italia*

**Filippo Martinelli Boneschi, Mattia Pozzato**, *IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Milano, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Numerose evidenze suggeriscono come la SM sia causata da una disregolazione del sistema immunitario prodotta dall'interazione tra fattori ambientali e genetici. La forma pediatrica della SM (PedMS) è una condizione privilegiata per esplorare i meccanismi coinvolti nello sviluppo della SM in quanto vicina alla possibile esposizione a fattori eziologici/ambientali, con la possibilità di studiarne il ruolo rispetto al background genetico. Il presente progetto è stato sviluppato per esplorare l'architettura genetica e l'interazione tra geni e fattori ambientali in un'ampia casistica italiana. Sono state incluse tre coorti di soggetti: i) pazienti con pedMS, esordio della SM < 18 anni di età, durata della malattia < 4 anni, ii) controlli sani appaiati per sesso ed età (HC), iii) adulti con SM ed esordio < 18 anni, senza limiti di durata di malattia.

## RISULTATI

- È stato sviluppato un questionario (tradotto dall'inglese, adattato e validato alla popolazione italiana) per esplorare i fattori ambientali con possibile ruolo nello sviluppo della SM (infezioni pregresse, vaccinazioni, esposizione al sole, peso corporeo, esposizione al fumo ecc.);
- sono stati inclusi in totale 571 soggetti grazie alla collaborazione attiva di 28 Centri SM italiani: i) 141 pazienti con ped-MS (in alcuni casi la durata di malattia è stata estesa fino a 5 anni in ragione del ritardo tra selezione del paziente e completamento delle procedure, a causa della pandemia da Covid-19, ii) 76 controlli (il reclutamento è ancora in corso per difficoltà dovute alla pandemia da Covid-19), iii) 354 pazienti adulti con SM a esordio pediatrico;
- sono stati sostanzialmente raggiunti tutti gli obiettivi del-

la fase 1 del progetto, tuttavia vogliamo sottolineare alcune criticità nella conduzione dello studio: i) la macchinosa approvazione della maggior parte dei CE, con notevole ritardo nell'approvazione da parte dei Centri coinvolti nella studio, ii) il notevole effetto della pandemia Covid-19, che ha profondamente modificato le attività nei Centri clinici e ha precluso l'accesso da parte di molti pazienti, iii) la difficoltà nel reclutare soggetti di controllo, per le ragioni di cui al punto precedente, e per la scarsa presenza di soggetti idonei nei centri SM dell'adulto. Per compensare questo difetto, i centri neuropediatrici sono ancora coinvolti nel reclutamento di casi di controllo.

## CONCLUSIONI

Al momento attuale, alla conclusione della fase 1 del progetto, abbiamo raccolto una delle più ampie coorti di pazienti con esordio pediatrico al momento disponibili. L'analisi dei determinanti genetici e la correlazione con l'esposizione a fattori ambientali, obiettivi della fase 2 del progetto, nonché obiettivi ulteriori che mirano a studiare il ruolo dei fattori epigenetici e il ruolo della composizione del microbiota intestinale nella SM pediatrica, potranno fornire nuove acquisizioni sui meccanismi coinvolti nella SM. Questi risultati potrebbero consentire di sviluppare nuovi interventi preventivi. Inoltre, abbiamo standardizzato e validato un questionario che potrebbe essere utilmente applicato a futuri studi epidemiologici sulla SM.

# Identification of genetic risk factors and interaction between genetic and non-genetic risk factors in pediatric multiple sclerosis (PEDiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) (PEDIGREE study)

## INTRODUCTION AND AIMS

There is a large body of evidence that MS is caused by the interaction between environmental and genetic factors that leads to a dysregulation of the immune system. The pediatric form of MS (PedMS) is a privileged condition to explore the mechanisms involved in MS development as close to exposure to etiological/environmental factors, with the possibility to study their role with respect to genetic background. The present project was designed to explore the genetic architecture and the interaction between genes and environment predisposing factors in a large Italian cohort. Three cohorts of subjects were included: i) pedMS patients with onset of MS before 18 years of age, disease duration < 4 years, ii) matched healthy controls (HC), iii) adults with onset < 18 years, no limit of disease duration.

## RESULTS

- A questionnaire has been developed (translated from English, adapted and validated to the Italian population) to explore environmental factors with a possible role to MS development (previous infections, vaccination, sun exposure, body weight, smoking exposure etc);  
- a total of 571 subjects have been included through the active collaboration of 28 Italian MS centers: i) 141 ped-MS patients (of note, disease duration was extended up to 5 years in some cases due to the delay between patient selection and completion of the procedures because of Covid-19 infection, ii) 76 controls (the recruitment is still

ongoing due to difficulties because of Covid-19 infection), iii) 354 adult patients with pediatric MS onset;  
- essentially we reached all the objectives of the phase 1 of the project, but it is worth to underline some problems in the study conduction: i) the cumbersome approval of the majority of ECs, with considerable delay in approval by the centers involved in the study, ii) the considerable effect of the Covid-19 pandemic, which changed the activities in clinical centers and also precluded the access for many patients, iii) the difficulty in recruiting control subjects, for the reasons referred to in the previous point, and due to the scarce presence of suitable subjects in adult MS centers. To compensate for this defect, the neuropediatric centers are still involved in recruiting control cases.

## CONCLUSIONS

Up to now, in the phase 1 of the project, we have collected one of the largest cohort of patients with pediatric onset available. The analysis of the genetic determinants and the correlation with exposure to environmental factors, aims of the phase 2 of the project, as well as additional aims which seek to study the role of epigenetic factors and of gut microbiota composition on pediatric MS, could produce new insights on the mechanisms of MS development. These results could permit also to develop new preventive interventions.

Moreover, we have standardized and validated a questionnaire that could be usefully applied to future epidemiological studies in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- S. Pilotto, J. Gencarelli, S.M. Bova, L. Gerosa, D. Baroncini, S. Olivotto, E. Alfei, M. Zaffaroni, A. Suppiej, E. Cocco, M. Trojano, M.P. Amato, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, E. Waubant, A. Ghezzi, R. Bergamaschi, M. Pugliatti. *Etiological research in pediatric multiple sclerosis: a tool to assess environmental exposures (PEQ-IT)*. *Mult. Scler. J. Exp. Translat. Clinical* Oct.-Dec. 2021, Doi: 10.1177/20552173211059048
- A.Ghezzi, M. Pugliatti, R. Bergamaschi, S. D'Alfonso, F. Martinelli Boneschi, E. Cocco, M. M.Trojano., M.P.Amato and the PEDIGREE Study Group (PEdiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) Study Group, *Environmental and genetic factors in pediatric multiple sclerosis (PEDIGREE Study)* European Charcot Foundation, Baveno 2020
- A.Ghezzi, M.P.Amato, R. Bergamaschi, E. Cocco, S. D'Alfonso, F. Martinelli Boneschi, M. Pugliatti, M.Trojano, and the PEDIGREE Study Group (PEdiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) Study Group, *Genetic and Environmental factors in pediatric multiple sclerosis (PEDIGREE Study)* Congresso SIN 2020
- S. Pilotto, J. Gencarelli, S.M. Bova, L. Gerosa, D. Baroncini, S. Olivotto, E. Alfei, M. Zaffaroni, A. Suppiej, E. Cocco, M. Trojano, M.P. Amato, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, E. Waubant, A. Ghezzi, R. Bergamaschi, M. Pugliatti. *Etiological research in pediatric multiple sclerosis: a tool to assess environmental exposures (PEQ-IT)*. XXV World Congress of Neurology - Virtually, 03-07/10/2021 (ePoster)
- S. Pilotto, J. Gencarelli, S.M. Bova, L. Gerosa, D. Baroncini, S. Olivotto, E. Alfei, M. Zaffaroni, A. Suppiej, E. Cocco, M. Trojano, M.P. Amato, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, E. Waubant, A. Ghezzi, R. Bergamaschi, M. Pugliatti. *Developing a tool to assess environmental exposures in the Italian pediatric-onset multiple sclerosis (PEQ-IT)*. ECTRIMS 2021 - DigitalExperience, 13-15/10/2021 (ePoster)

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 128.500 €**  
Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 2 years and the amount of € 128,500

# Sviluppo di uno strumento per identificare il ruolo prognostico di fattori di rischio ambientale modificabili sul decorso della sclerosi multipla nel contesto di ricerca internazionale (EnvIMS-Pro-Q)



## Maura Pugliatti

*Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Caterina Ferri, Elisa Baldin, Ilaria Casetta, Vittorio Govoni, Enrico Granieri, Massimiliano Castellazzi, Silvy Pilotto**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHERS GROUPS

**Christina Wolfson**, *Dept. of Epidemiology and Biostatistics and Occupational Health, McGill University, Montreal, Canada*

**Sandra Magalhaes**, *University of New Brunswick, Canada*

**Trond Riise**, *Dept. of Lifestyle and Global Science, University of Bergen, Norway*

**Kjel-Morten Myhr**, *Dept. of Neurology, University of Bergen, Norway*

**Jelena Drulovic**, *Inst. of Neurology - Multiple Sclerosis Center, University of Belgrade, Serbia*

**Tatjana Pekmezovic**, *Inst. of Epidemiology, University of Belgrade, Serbia*

**Maurizio Leone**, *Unit of Neurology - IRCCS Opera Padre Pio, S. Giovanni Rotondo (FG), Italy*

**Paolo Ragonese**, *Dept. of Neurology, University of Palermo, Italy*

## INTRODUZIONE E OBIETTIVI

La attività infiammatoria e la progressione nella sclerosi multipla (SM) dipendono anche dall'azione di fattori di rischio con significato eziologico, quali bassi livelli serici di vitamina D e abitudine al fumo di sigaretta. Tuttavia la metodologia utilizzata per lo studio di questi fattori nella progressione della SM è assai eterogenea per disegno di studio, selezione degli outcome e misurazione.

EnvIMS-Pro-Q si costruisce sulla metodologia dello studio multinazionale 'EnvIMS' sul ruolo di fattori di rischio ambientali nell'incidenza di SM (FISM 2008-2011) e ha per obiettivo lo sviluppo di una metodologia condivisibile per studiare il ruolo di fattori e comportamenti potenzialmente modificabili responsabili della progressione della SM provenienti da letteratura scientifica esistente e per la costruzione di studi prospettici.

EnvIMS-Pro-Q è stato specificamente disegnato per identificare la migliore strategia metodologica nella misurazione dei suddetti fattori e del loro peso nel peggioramento della SM individuale o aggregato in 'comportamenti a rischio'.

Le attività di ricerca sul progetto hanno implicato una revisione comprensiva della esistente letteratura scientifica sia sui fattori di rischio, che sui più appropriati outcome (es., 'patient-reported outcomes') e le proprietà di misurazione.

## RISULTATI

EnvIMS-Pro-Q riceveva approvazione dal comitato etico il 22.04.20 (Prot. N. 366/2020/Oss/AOUFe) e da allora incontrava difficoltà e ritardi in relazione alla situazione pandemica da Covid-19. Mentre, infatti, il protocollo originale era stato costruito attorno alla possibilità di effettuare incontri in persona e soprattutto un workshop a carattere internazionale formativo con la partecipazione di esperti sui vari fattori e comportamenti di rischio identificati in letteratura per una prioritizzazione degli stessi attraverso il metodo Delphi, tutto ciò veniva inizialmente rimandato e successivamente definitivamente cancellato per il persistente stato pandemico.

Il lavoro di collaborazione è stato pertanto svolto in maniera virtuale attraverso incontri online con cadenza di

4-6 settimane, coordinato da uno 'Steering Committee' composto dal Responsabile Scientifico del progetto, dalla Dr.ssa C. Wolfson (McGill University, Montreal, Canada), esperta in metodologia di studio, le Dr.sse Ferri e Pilotto (Università di Ferrara) e la Dr.ssa Gauvin. È stata condotta una revisione comprensiva della letteratura scientifica del periodo 2000-21 secondo metodologia standard e sono stati dapprima selezionati fattori di rischio coinvolti nell'esordio della malattia, quali stile di vita (es., abitudine al fumo di sigaretta, bassi livelli serici di vitamina D), dipendenze (es., alcool, uso di cannabis), dieta ('pro' verso 'anti' infiammatoria), attività fisica, fattori occupazionali, inquinanti ambientali, infezioni (incluso da SARS-CoV-2), vaccinazioni. L'importante impatto dello stato pandemico sulla gestione dei pazienti con SM ha messo in luce altri potenziali fattori prognostici di progressione di malattia, quali ad esempio il ritardo nella presa in carico, variabili incluse nella nostra ricerca.

I fattori o comportamenti considerati dovevano dimostrare un potenziale ruolo prognostico sul peggioramento della SM ad esempio sui tempi di esposizione, provenire da studi di elevata qualità metodologica, e dovevano poter essere studiati a mezzo di questionari autosomministrati. I seguenti macro-domini sono stati inclusi nella ricerca: esposizioni ambientali (es., stile di vita, occupazionali, inquinanti ambientali, infezioni), esposizioni in relazione al

servizio sanitario (es., qualità di accesso ai servizi dedicati alla SM), caratteristiche specifiche del paziente (età, sesso, frequenza di ricadute, decorso di malattia, EDSS, carico alla risonanza magnetica).

Per quanto concerne gli outcome, sono stati considerati l'aumento del punteggio EDSS rispetto a un basale, il tempo trascorso tra l'aver un punteggio EDSS di 3 o 4 e 6, la progressione confermata, misure di risonanza magnetica e di qualità di vita.

Alcune attività del progetto – per i motivi legati alla situazione pandemica – sono in corso di svolgimento, tra cui il completamento della fase 'Delphi' insieme a esperti selezionati ad hoc, e lo sviluppo effettivo dello strumento (algoritmo) EnvIMS-Pro-Q.

## CONCLUSIONI

Una migliore conoscenza del ruolo prognostico di determinati fattori di esposizione o comportamenti a rischio in persone con SM può contribuire a una gestione ottimale e personalizzata per la prevenzione dell'attività e della progressione di malattia. EnvIMS-Pro-Q potrebbe contribuire a migliorare la metodologia degli studi prognostici su SM attraverso l'armonizzazione e la standardizzazione della raccolta di dati sui fattori di rischio e sul disegno di nuovi studi, con implicazioni positive sulla prevenzione secondaria e la cura della persona con SM.

# Developing a tool for investigating the prognostic role of modifiable environmental risk factors in multiple sclerosis disease course in multinational research (EnvIMS-Pro-Q)

## INTRODUCTION AND AIMS

Progression and activity in multiple sclerosis (MS) may depend on the action of risk factors also involved in the disease etiology, such as low vitamin D serum levels and cigarette smoking habit. However, the methodology used to assess the role of these factors or behaviors in MS progression varies considerably across studies, in relation to study design, selected outcomes and measurements. Building from a large multinational population-based study ('EnvIMS Study') on the etiological role of environmental factors in the incidence of MS (FISM 2008-2011), EnvIMS-Pro-Q ultimately aims to develop shareable methodology to investigate the prognostic role of modifiable environmental factors in the course of MS (activity and progression) to be used in many settings by independent research groups to capture relevant information from both existing literature and new prospective studies.

EnvIMS-Pro-Q was specifically designed to identify the best measurement strategy for the most informative factor(s) to disease course change both independently considered and aggregated into 'risk behaviors'. EnvIMS-Pro-Q research plan included comprehensive reviews of existing literature on the role of lifestyle factors in MS worsening, on most appropriate outcomes (incl., patient-reported ones) and measurement properties.

## RESULTS

EnvIMS-Pro-Q received ethical clearance on April 22 2020 (Prot. N. 366/2020/Oss/AOUFe). EnvIMS-Pro-Q has ever since suffered from delays and inconveniences in relation to the Covid-19 pandemics. While the original proposal pivoted on face-to-face meetings and the organization of an international workshop to be held in Ferrara to allow experts participate in Delphi rounds, all this had

to be initially postponed and then cancelled due to the persistent pandemics emergency state. All the collaborative work was therefore conducted remotely via virtual meetings.

A Steering Committee was established to coordinate the Project phases and composed of the P.I. (Applicant), Dr C. Wolfson (McGill University, Montreal, Canada), expert in study designs and survey tools constructs, Drs. Ferri and Pilotto (from P.I.'s Institution) and one doctoral student, Dr. Gauvin (McGill University). The conceptual framework for developing the EnvIMS-Pro-Q tool was discussed and defined via virtual meetings once every 4-6 weeks. A scoping review was conducted on existing literature for the period 2000-21 according to standard approach. Environmental factors putatively involved in MS onset (eg., cigarette smoking habit, vitamin D serum levels), but also on dependencies (eg., alcohol, different smoking habit, cannabis use), diet ('pro' vs 'anti' inflammatory diet), physical activity, occupational exposures, pollutants, infections (including Sars-Cov-2), vaccinations were prioritized. The Covid-19 pandemics and its strong impact on the management of people with MS disclosed other potential conditions contributing to the disease worsening such as therapeutic delays and these variables too were finally included in our search.

Relevant studies were scrutinized based on reviewing titles and abstract and were deemed eligible for our review if evidence was potentially a prognostic factor to MS worsening, if it was identified by at least 1 high quality study, if they were deemed relevant to adult MS progression/worsening (eg., timing of exposure), and if they could be investigated through interview or self-reported question-

naire, or available from existing datasets.

The following macro-domains of prognostic factors were identified for the research purposes: environmental exposures (eg., lifestyle factors occupational exposures, pollutants, infections -including Sars-Cov-2- and vaccinations), health care related exposures (eg., quality of access to dedicated health care system) and patients' specific features (eg., age, sex, relapse rate, disease course, EDSS, MRI burden of activity).

The main outcomes identified with EnvIMS-Pro-Q comprise increased EDSS score compared to baseline scores, the time elapsed between EDSS 3 or 4 and 6, confirmed progression, magnetic resonance imaging (MRI) measures, quality of life measures.

Ongoing activities which were not yet performed due to organizational delays in the pandemics era comprise reaching consensus from all participants and ad hoc selected experts and on most relevant MS prognostic factors and the EnvIMS-Pro tool development.

## CONCLUSIONS

A better understanding of the role of modifiable environmental prognostic behaviours and the subsequent profiling of MS patients by environmental exposure may suggest new personalized therapeutic strategies for MS to prevent disease worsening.

EnvIMS-Pro-Q aims to provide a new epidemiological tool, to overcome methodological pitfalls of prognostic studies by harmonizing and standardizing existing data collection on risk behaviours or from new prospective studies. EnviMS-Pro-Q may ultimately have implications on MS secondary prevention and patient care.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 25-27, ottobre 2021*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 26.540 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 10 months) and the amount of € 26,540



# Inquinamento dell'aria e sclerosi multipla: ruolo dell'esposizione al particolato (PM) e del traffico di vescicole extracellulari associato nella neuroinfiammazione e demielinizzazione



## Enrica Boda

Dipartimento di Neuroscienze 'Rita Levi Montalcini', Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Università degli Studi di Torino, Orbassano (TO), Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS:  
**Roberta Parolisi**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS  
**Francesca Montarolo, Antonio Bertolotto**, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO) e Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla, Orbassano (TO), Italia  
**Valentina Bollati, Luca Ferrari**, EPIGET Lab, Dipartimento di Scienze cliniche e di comunità, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Studi epidemiologici mostrano che l'esposizione al particolato atmosferico (PM) è associata a un numero maggiore di diagnosi e recidive di sclerosi multipla (SM) e all'esacerbazione della neuroinfiammazione nei pazienti con SM, suggerendo che l'esposizione al PM possa agire come fattore di rischio per la SM in soggetti predisposti.

A livello polmonare, l'inalazione di PM è associata all'attivazione dei macrofagi e di altre cellule e al rilascio di vescicole extracellulari (VE) nel sangue. Le VE possono attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) e veicolare molecole verso il sistema nervoso centrale (SNC). Nell'uomo, il contenuto delle VE rilasciate dopo l'esposizione al PM include un repertorio di miRNA che possono contribuire all'autoimmunità, alla neuroinfiammazione e al fallimento della riparazione della mielina. Ciò suggerisce che l'esposizione al PM possa contribuire alla patogenesi della SM attraverso l'azione di miRNA associati alle VE.

I pazienti con SM sembrano essere particolarmente vulnerabili agli effetti del PM, suggerendo che le risposte biologiche innescate dal PM nelle persone con SM possano differire rispetto a quelle attivate negli individui sani, e sinergizzano con il substrato biologico dell'individuo per promuovere il peggioramento della malattia.

Pertanto, gli obiettivi di questo progetto pilota sono stati:  
1. valutare gli effetti dell'esposizione al PM in esperimenti

controllati in modelli animali di SM;

2. caratterizzare le VE e i miRNA associati nel sangue di topi sani e topi predisposti a sviluppare autoimmunità contro la mielina (encefalomielite sperimentale autoimmune, ESA) in seguito all'esposizione al PM.

## RISULTATI

Per validare l'esposizione al PM come fattore di rischio per l'emergenza/progressione della SM in un modello animale della malattia, abbiamo combinato l'induzione dell'ESA nei topi e l'esposizione al PM. I topi sono stati esposti al PM (o alla soluzione salina, come controllo) in modo acuto, prima dell'immunizzazione o durante la fase presintomatica, oppure cronicamente. L'esposizione acuta al PM non altera il decorso clinico della malattia, ma fa emergere un fenotipo comportamentale simile all'ADHD (disturbo da deficit di attenzione e iperattività) nei topi ESA e non nei topi sani. L'esposizione cronica al PM porta a una modesta anticipazione della comparsa dei deficit motori nei topi ESA, suggerendo che gli effetti del PM possano modulare le funzioni delle cellule immunitarie, l'integrità della barriera ematoencefalica e/o il danno della mielina.

Per studiare l'effetto dell'esposizione al PM sulla riparazione della mielina nel SNC, abbiamo sfruttato un modello murino di lesione della sostanza bianca, in cui la demielinizzazione è seguita dalla riparazione spontanea della

mielina, sostenuta dai progenitori degli oligodendrociti (OPC). I topi sono stati esposti in modo acuto al PM 7 giorni dopo la lesione (dpl), all'inizio della maturazione degli OPC. Gli effetti sono stati studiati a 14 dpl, quando la rimielinizzazione non è ancora completa. L'esposizione post-lesione al PM ostacola la rimielinizzazione, rallenta la maturazione degli OPC e promuove la reattività dell'astroglia e della microglia.

Per identificare i meccanismi che mediano gli effetti del PM e chiarire se gli individui già predisposti allo sviluppo dell'autoimmunità (cioè già immunizzati per sviluppare l'ESA) reagiscono in modo diverso all'esposizione al PM, abbiamo caratterizzato le VE (numero, dimensioni e origine cellulare) e i miRNA associati alle VE nel plasma di topi sani e topi ESA presintomatici esposti a PM, rispetto a topi sani e ESA non esposti. I topi predisposti a sviluppare l'ESA rispondono in modo diverso - in termini di numero di VE plasmatiche, dimensioni e contenuto di miRNA - all'esposizione al PM, rispetto ai topi sani. La risposta al

PM dei topi ESA non corrisponde semplicemente all'esacerbazione delle differenze molecolari fra topi sani e ESA non esposti. I miRNA rilasciati in seguito all'esposizione al PM sono rilevanti per la SM sia nei topi sani sia in quelli ESA. Tuttavia, la risposta al PM dei topi ESA appare più "patogena" di quella dei topi sani.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati mostrano che, nei modelli animali, l'esposizione acuta al PM ha un impatto diverso sugli individui predisposti a sviluppare autoimmunità rispetto a quello sui soggetti sani, sia a livello comportamentale, sia a livello molecolare. Inoltre, l'esposizione al PM ostacola la riparazione della mielina, suggerendo che l'esposizione al PM possa contribuire alle patologie demielinizzanti interferendo con la capacità rigenerativa endogena del tessuto nervoso. Questi risultati sono in linea con l'idea che l'esposizione al PM possa contribuire a peggiorare il decorso clinico e le funzioni cognitive dei pazienti con SM.

# Air pollution and multiple sclerosis: role of particulate matter (PM) exposure and associated extracellular vesicle trafficking in neuroinflammation and demyelination

## INTRODUCTION AND AIMS

Epidemiological studies have shown that exposure to airborne particulate matter (PM) is associated with higher rates of multiple sclerosis (MS) diagnoses, relapses and exacerbation of neuroinflammation in MS patients, suggesting that PM exposure may operate as a risk factor for MS/MS relapses in predisposed subjects.

At the pulmonary level, PM inhalation is associated with activation of macrophages and other cells, and with the consequent release of extracellular vesicles (EVs) in the bloodstream. Such EVs can cross the blood-brain barrier and vehicle functionally-relevant molecules to the central nervous system (CNS). Interestingly, recent studies showed that the cargo of the EVs released after PM exposure includes a repertoire of miRNAs that can contribute to autoimmunity, CNS infiltration, neuroinflammation and limiting myelin repair. This prompts the hypothesis that PM exposure may contribute to MS pathogenesis through the delivery of EV-associated miRNAs.

MS patients appears particularly vulnerable to PM effects, suggesting that, in MS patients, the biological responses triggered by PM may differ compared to those activated in healthy subjects and synergize with the in-

dividual's immune setting to promote disease progression/exacerbation.

Thus, the aims of this pilot project were:

AIM 1. Assessing the effects of PM exposure in controlled experiments in animal models of MS;

AIM 2. Characterizing the EVs and associated miRNAs in the blood of healthy vs. mice primed to develop autoimmunity against myelin (i.e. experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) upon exposure to PM (compared to unexposed healthy and EAE subjects), in order to identify target mechanisms mediating PM effects and possible interactions between PM exposure and autoimmunity in MS pathogenesis.

## RESULTS

To validate PM exposure as a risk factor for MS emergence/progression in an animal model of the disease, we have combined the induction of EAE in mice and PM exposure. To study the effects of both short- and long-term PM exposures, mice were exposed to PM (or saline, as a control) either acutely, before the immunization or during the pre-symptomatic phase or chronically. Acute PM exposures did not modify the disease course, but resulted in the emergence of an ADHD



(attention deficit hyperactivity disorder)-like behavioral phenotype in EAE mice that was not observed in healthy mice. Chronic PM exposure slightly accelerated the emergence of motor deficits in EAE mice, suggesting that PM biological effects may contribute to modulate immune cell functions, BBB integrity and/or myelin injury.

To investigate whether PM exposure can affect myelin repair in the CNS, we exploited a mouse model of white matter lesion, where acute demyelination is followed by spontaneous myelin repair sustained by resident oligodendrocyte progenitors (OPCs). Mice were acutely exposed to PM at 7 days' post-injury (dpi), a time window corresponding to the start of OPC differentiation. The effects were studied at 14 dpi, when remyelination has not reached a plateau. Data showed that the post-injury exposure to PM hampers remyelination, disturbs oligodendroglia differentiation dynamics and promotes astroglia and microglia reactivity.

To identify the mechanisms mediating PM effects and clarify whether individuals already primed toward the development of autoimmunity (i.e. already immunized to develop EAE) react differently to PM exposure, we characterized EVs (i.e. number, size and cellular source) and EV-associated miRNAs profile in the plasma of

healthy and presymptomatic EAE mice exposed to PM, compared to unexposed healthy and EAE mice.

Mice primed to develop EAE responded differently - in terms of plasmatic EV number, size and miRNA cargo - to PM exposure, compared to healthy mice. The response to PM of EAE mice did not simply correspond to the exacerbation of EAE vs healthy differences. In both healthy and EAE mice, the miRNA cargo of plasma EVs released following PM exposure had a signature relevant for MS. However, dysregulated miRNAs were distinct and EAE response appeared more "pathogenic" than that of healthy mice.

## CONCLUSIONS

Our results show that, in animal models, acute exposure to PM differently impact on individuals primed to develop autoimmunity compared to healthy subjects, at both behavioral and molecular level. Moreover, exposure to PM hampers myelin repair, supporting the view that exposure to PM can contribute to demyelinating pathologies by targeting the endogenous regenerative capability of the CNS tissue. These results are in line with the idea that exposure to airborne PM may contribute to worsen the clinical course and cognitive functions of MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni

- Parolisi R, Montarolo F, Pini A, Rovelli S, Cattaneo A, Bertolotto A, Buffo A, Bollati V, Boda E. Exposure to fine particulate matter (PM 2.5) hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. *Neurochem Int.* 2021 May; 145:104991. doi: 10.1016/j.neuint.2021.104991

### Comunicazioni orali a Congressi

- Roberta Parolisi - Exposure to fine particulate matter hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. XXX Convegno Nazionale del Gruppo Italiano per lo Studio della Neuromorfologia (GISN), 13 Nov 2020 (virtual)

- Roberta Parolisi - Exposure to fine particulate matter hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. III incontro Nazionale Morfologia e Dintorni, 26 Oct 2020 (virtual)

### Posters presentati a Congressi

- Parolisi R, Montarolo F, Pini A, Rovelli S, Cattaneo A, Bertolotto A, Buffo A, Bollati V, Boda E. Particulate matter 2.5 (PM2.5) exposure hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. XV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 8 Jul 2021 (virtual). Published in *Glia* (Wiley) 69, E521-E522

### Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

# Effetti del sesso biologico sull'attività immunitaria umorale intratecale e la progressione di malattia nella sclerosi multipla



## Francesca Gilli

*Department of Neurology, Dartmouth Hitchcock Medical Center & Geisel School of Medicine at Dartmouth, Lebanon, New Hampshire, US*

COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Nora Welsh, Michael Linzey, Krista DiSano, Andrew Pachner**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) evidenzia chiare differenze di genere: le donne hanno un'incidenza maggiore e una maggiore infiammazione, mentre gli uomini hanno una progressione della malattia più rapida e peggiore. I meccanismi alla base di queste differenze non sono ancora del tutto chiari. Tuttavia, è accertato che il sesso biologico influenza significativamente l'infiammazione nel cervello, in particolare le risposte immunitarie umorali, ossia la produzione di anticorpi.

Gli studi che correlano la sintesi delle immunoglobuline nel liquor spinale (SIlg) e le risposte dei linfociti B con la progressione della malattia nella SM ci hanno portato a ipotizzare che un aumento e/o una disregolazione della SIlg possano aumentare il tasso di progressione della malattia nei maschi rispetto alle femmine. Pertanto, l'obiettivo di questo progetto era di determinare come le differenze di sesso nella risposta immunitaria umorale guidata dai linfociti B influenzino in modo diverso la progressione della SM negli uomini e nelle donne.

### RISULTATI

Per prima cosa abbiamo applicato un approccio statistico tradizionale che include in un singolo modello ogni marcatore di SIlg individualmente, per calcolare i classici parametri statistici, quali media, mediana, deviazione ed errore standard, aggiustando per età e forma della malattia. Considerando l'indice IgG, il numero di bande oligoclonali di IgG (OCB) e gli indici calcolati per le immunoglobuline IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM, non si sono rilevate differenze significative tra pazienti maschi e femmine. Sono stati anche valutati statisticamente diversi marcatori aggiuntivi (n=57) di infiammazione e danno del cervello. Anche per questa analisi, non si sono rilevate differenze significative tra i due gruppi, ad eccezione della proteina RAGE, Receptor for Advanced Glycation Endproducts.

I livelli di RAGE erano infatti più alti nei maschi rispetto alle femmine ( $p=0.03$ ). In precedenza, è stato dimostrato che RAGE influenza la differenziazione delle cellule B e la produzione di autoanticorpi. Poiché tutti i marcatori analizzati sono incorporati all'interno di complessi processi regolatori, abbiamo successivamente applicato strumenti computazionali avanzati volti a discernere le reti che collegano l'infiammazione e il danno nel cervello di uomini e donne con SM recidivante-remittente. In definitiva, questa analisi ha mostrato che l'infiammazione, principalmente le risposte immunitarie umorali guidate dai linfociti B e il danno cerebrale sono strettamente collegati nei pazienti maschi ma non nelle femmine.

Sebbene con questo studio non abbiamo potuto confermare la nostra ipotesi iniziale che un aumento della SIlg acceleri il tasso di progressione della malattia nei maschi rispetto alle femmine, il nostro lavoro ha comunque dimostrato che le risposte immunitarie umorali guidate dai linfociti B, inclusa l'SIlg, sono più strettamente correlate al danno cerebrale nei maschi rispetto alla propria controparte femminili.

### CONCLUSIONI

La nostra analisi di rete ha dimostrato un modello molecolare intratecale che differenzia i pazienti con SM maschi e femmine e dimostra un coinvolgimento sostanziale delle risposte immunitarie umorali guidate dai linfociti B, inclusa la SIlg, nella progressione del danno cerebrale nella popolazione maschile piuttosto che in quella femminile. Queste analisi dimostrano una forma precedentemente sconosciuta di dimorfismo sessuale nell'infiammazione cerebrale e il suo ruolo nell'impatto sulla progressione della malattia della SM. In definitiva, queste osservazioni favoriranno lo sviluppo di trattamenti e piani di monitoraggio della malattia più adeguati e personalizzati.

# Sex effects on intrathecal humoral inflammation and disease progression in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a sexually dimorphic disease: women have a higher incidence and more inflammation, but men have a faster and worse disease progression. The mechanisms underlying these differences are not fully understood yet. However, it is established that sex affects inflammation in the brain, especially the humoral immune responses, i.e., antibody production.

Studies correlating intrathecal synthesis of immunoglobulins (IIgS) and B cell responses with disease progression in MS lead us to hypothesize that increased and/or dysregulated IIgS may increase the disease progression rate in males compared to females. Therefore, the goal of this proposal was to determine how sex differences in intrathecal B-cell-driven humoral immune response differently affect the disease progression in men and women with MS.

## RESULTS

We first applied a standard statistical approach, including each IIgS marker individually in a model and calculating classical statistic parameters, i.e., mean, median, standard deviation, and standard error, adjusting for age and disease form. No significant differences were detected between male and female patients when considering IgG index, the number of IgG oligoclonal bands (OCBs), and Igs indices calculated for IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgM. Several additional markers (n=57) of inflammation and brain injury were also statistically evaluated. Significant differences between the two groups were not detected for all markers except for the protein RAGE, Receptor for

Advanced Glycation Endproducts. Levels of RAGE were indeed higher in males than female patients ( $p=0.03$ ). Previously, RAGE was shown to affect B cell differentiation and associated autoantibody production.

Since all analyzed markers are embedded within complex regulatory processes, we next applied advanced computational tools aimed at discerning networks linking inflammation and injury in the brain of men and women with relapsing-remitting MS. Ultimately, this analysis showed that inflammation, mainly B-cell driven humoral immune responses, and brain injury are highly connected in male but not female patients.

Although we did not confirm our initial hypothesis that increased IIgS may enhance the rate of disease progression in males compared to females, we ultimately demonstrated that B-cell driven humoral immune responses, including IIgS, are more strictly related to brain injury in males than their female counterparts.

## CONCLUSIONS

Our network analysis uncovers intrathecal molecular patterns that differentiate male and female MS patients and demonstrate a substantial involvement of B-cell driven humoral immune responses, including IIgS, in the progression of brain damage in the male rather than the female population. These analyses demonstrate a previously unknown form of sexual dimorphism in brain inflammation and its role in impacting MS disease progression. This will ultimately favor the development of more adequate and personalized treatments and disease monitoring plans.

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 11 mesi) e l'ammontare di 140.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 11 months) and the amount of € 140,000

# Effetto dei cambiamenti metabolici, indotti da un'associazione di probiotici e prebiotici e mediati dal microbiota, sulla modulazione delle risposte immuni nella sclerosi multipla



## Alice Laroni

*Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica, e Scienze Materno Infantili, Università di Genova, Italia*

COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Federico Carlini, Valeria Lusi, Irene della Valle, Serena Palmeri, Davide Bagnara, Margherita Squillario**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Ricerche recenti suggeriscono che i microbi che vivono nell'intestino dell'uomo possano contribuire alla salute o alla malattia, e influenzare il rischio di sclerosi multipla (SM). Ciò nonostante, il modo in cui i microbi intestinali influenzano il rischio di SM non è noto. Abbiamo dimostrato, in una ricerca precedente, che alcuni meccanismi di controllo del sistema immunitario, mediati da cellule chiamate 'natural killer (NK) regolatorie', non funzionano bene nella SM. Queste cellule, infatti, nelle persone sane sono in grado di uccidere alcune cellule che nella SM sono dannose, i linfociti T attivati, mentre nella SM non lo fanno. In particolare, poiché si sa che i microbi intestinali producono molecole che dall'intestino passano nel sangue e possono avere un effetto sul sistema immunitario, ipotizziamo che alcune di queste molecole influenzino il meccanismo attraverso cui le cellule NK regolatorie controllano i linfociti T. L'obiettivo di questo progetto pilota è stabilire se alcune molecole prodotte dai microbi intestinali siano in grado di interferire con la funzione delle cellule NK, e in particolare modificare la loro funzione di regolazione dei linfociti T.

## RISULTATI

Ci siamo focalizzati in particolare su due tipi di molecole prodotte dai microbi dell'intestino: gli acidi grassi a catena corta, prodotti da alcuni batteri intestinali in risposta alla digestione delle fibre, e i derivati del triptofano. Come primo risultato abbiamo dimostrato l'effetto delle molecole prodotte dai microbi sul fenotipo delle cellule NK e dei linfociti T. Abbiamo scoperto che coltivando in vitro i globuli bianchi isolati dal sangue periferico di persone sane in

presenza del butirrato, un acido grasso a catena corta, il numero di cellule NK regolatorie diminuisce.

In presenza della stessa molecola, le cellule NK regolatorie e le cellule NK tradizionali si attivano e aumentano la loro capacità di localizzarsi nei tessuti, aumentando la loro espressione di una molecola chiamata CD69. Un derivato del triptofano chiamato indolo-acido lattico ha l'effetto opposto. Il butirrato, inoltre, diminuisce l'espressione della molecola regolatoria PD-1 nelle cellule NK regolatorie. Il butirrato ha un effetto anche nei linfociti T, aumentando in essi la capacità di localizzarsi nei tessuti e attivarsi; inoltre, solo nei linfociti T, il butirrato aumenta la molecola regolatoria PD-1.

Abbiamo poi studiato se le molecole prodotte dai microbi intestinali siano in grado di modificare la capacità regolatoria delle cellule NK. In linea con i risultati precedenti, il butirrato rende le cellule NK regolatorie di persone sane incapaci di uccidere i linfociti T attivati.

Infine, abbiamo studiato se le molecole prodotte dai microbi vadano a interferire con la regolazione della funzione delle cellule NK e delle cellule T agendo sul loro DNA, esaminando quali regioni del DNA siano disponibili alla trascrizione in proteine e quali invece non lo siano. Abbiamo osservato che il butirrato modifica il numero di regioni di DNA chiuse (non trascritte) e aperte nelle cellule NK, regolando alcuni geni coinvolti nella regolazione della loro funzione e attivazione.

Nell'ambito di questo progetto abbiamo inoltre studiato la composizione delle cellule NK in un luogo molto importante per la regolazione della funzione immunitaria, il midollo osseo, scoprendo che le persone con SM presen-

tano un minor numero di cellule NK capaci di risiedere a lungo nel midollo osseo. Infine, abbiamo studiato l'effetto di una terapia per la SM, alemtuzumab, sulle cellule NK, dimostrando che nelle persone che rispondono alla terapia, queste cellule aumentano.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano per la prima volta che il butirrato, un acido grasso a catena corta, ha un effetto sulle cellule NK nelle persone sane, diminuendo la percentuale di cellule regolatorie e rendendo le cellule regolatorie meno efficienti, probabilmente attraverso una modulazione della trascrizione del DNA. Il prossimo passo

di questa ricerca sarà dimostrare se un aumento di butirrato nell'intestino o nel sangue delle persone con SM sia associato alla diminuzione della funzione regolatoria delle cellule NK stesse. Questo sarà il prerequisito per progettare terapie che correggano la disfunzione delle cellule NK attraverso la modulazione degli acidi grassi a catena corta. La diversa composizione di cellule NK nel midollo osseo tra persone con SM e persone sane suggerisce che questo possa interferire con la regolazione immunitaria in quella sede.

Infine, la nostra ricerca suggerisce che le cellule NK possano essere usate come marcatore di risposta alla terapia con alemtuzumab nella SM.

# Impact of prebiotic/probiotic-mediated changes in microbe-derived metabolites on dysfunctional innate immune responses in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Recent researches suggest that microbes that live in the human gut may contribute to health or disease, and to the risk of multiple sclerosis (MS). Nonetheless, the way the intestinal microbes affect the risk of MS is unknown. We have previously shown that some regulatory mechanisms of the immune system, mediated by cells called 'regulatory natural killer (NK)', do not work properly in MS. These cells, in fact, are able to kill the activated T lymphocytes (a cell type which can be harmful in MS) in healthy people, while in MS they are not. Since gut microbes are known to produce molecules that pass from the gut into the blood and can have an effect on the immune system, we hypothesize that some of these molecules influence the mechanism by which NK cells regulate T lymphocytes. The goal of this pilot study is to establish whether the molecules produced by intestinal microbes are able to interfere with the function of NK cells, and in particular affect their regulatory function.

## RESULTS

We focused on two types of molecules produced by gut microbes: short-chain fatty acids, produced by some intestinal bacteria in response to the digestion of fibers, and tryptophan derivatives. As a first result we demonstrated the effect of molecules produced by microbes on the phenotype of NK cells and T lymphocytes. We found that by culturing white blood cells isolated from the peripheral blood of healthy people in the presence of a short-chain fatty acid, butyrate, the number of regulatory NK cells decreases. In the presence of the same molecule, regu-

latory NK cells and traditional NK cells become activated and increase their ability to localize in tissues, increasing their expression of a molecule called CD69. A derivative of tryptophan, called indole-lactic acid, has the opposite effect. Butyrate also decreases the expression of the regulatory molecule PD-1 in regulatory NK cells.

Moreover, we found that butyrate has an effect on T lymphocytes, increasing their ability to localize in the tissues and get activated; moreover, only in T lymphocytes, butyrate increases the regulatory molecule PD-1. Next, we investigated whether the molecules produced by intestinal microbes are able to affect the regulatory capacity of NK cells. Consistent with previous findings, butyrate renders the regulatory NK cells of healthy people unable to kill activated T lymphocytes. Finally, we investigated whether the molecules produced by microbes interfere with the regulation of the function of NK cells and T cells by acting on their DNA, examining which regions are available for transcription into proteins and which are not. We observed that butyrate modifies the number of closed (non-transcribed) and open DNA regions in NK cells, regulating some genes involved in the regulation of their function and activation.

As part of this project, we also studied the composition of NK cells in a very important place for the regulation of immune function, the bone marrow, and found that people with MS have fewer NK cells capable of residing in the bone marrow for a long time. Finally, we studied the effect of an MS therapy, alemtuzumab, on NK cells, showing that in people who respond to therapy, these cells increase.

## CONCLUSIONS

The results of this study demonstrate for the first time that a short-chain fatty acid, butyrate, has an effect on NK cells in healthy people, decreasing the percentage of regulatory cells and making regulatory cells less efficient, possibly through modulation of DNA transcription. The next step in this research will be to demonstrate whether an increase in butyrate in the intestine or in the blood of people with MS is associated with a decrease in the regu-

latory function of the NK cells. This will be the prerequisite for designing therapies that correct NK cell dysfunction through modulation of short-chain fatty acids.

The different composition of NK cells in the bone marrow between people with MS and healthy people suggests a local disrupted NK-mediated immune regulation.

Finally, our research suggests that NK cells may be used as a marker of response to alemtuzumab therapy in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Palmeri S, Ponzano M, Ivaldi F, Signori A, Lapucci C, Casella V, Ferrò MT, Vigo T, Inglese M, Mancardi GL, Uccelli A, Laroni A *Impact of Natural Killer (NK) Cells on Immune Reconstitution, and Their Potential as a Biomarker of Disease Activity, in Alemtuzumab-Treated Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: An Observational Study. CNS Drugs. 2022 Jan;36(1):83-96. doi: 10.1007/s40263-021-00875-0. Laroni A, Uccelli A. CD56bright Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis. J Clin Med. 2020 May 13;9(5):1450. doi: 10.3390/jcm9051450.*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 10 months) and the amount of € 30,000



# Studio del ruolo dei nodi epigenetici aberranti nella deregolazione immunologica delle cellule T CD4+ nella sclerosi multipla



## Francesca Santoni de Sio

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto San Raffaele-Telethon per la Terapia Genica (SR-TIGET), Milano, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Daniele Avancini, Alessandro Testori, Laura Passeri, Silvia Gregori, Laura Passerini**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Vittorio Martinelli, Unità di Neurologia, Istituto Scientifico San Raffaele IRCCS, Milano, Italia**

**Monica Volpin, Giulio Spinozzi, Eugenio Montini, Unità di Biosicurezza della Terapia Genica e Mutagenesi Inserzionale, Istituto Scientifico San Raffaele IRCCS, Milano, Italia**

**Ivan Merelli, Istituto di Tecnologie Biomediche, Centro Nazionale delle Ricerche, Segrate, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La patogenesi della sclerosi multipla (SM) ha origine auto-immune, causata dall'attivazione di linfociti auto-reattivi (cellule T CD4+ helper) e dalla loro infiltrazione nel sistema nervoso centrale. Sebbene studiati approfonditamente, i meccanismi molecolari patogenetici, inclusi i difetti intrinseci delle cellule CD4+ effettrici e regolatorie, rimangono largamente oscuri. L'epigenetica è l'insieme dei meccanismi che modificano lo stato della cromatina (combinazione di DNA genomico e proteine), rendendo elementi genetici regolatori e geni accessibili o meno ai fattori che inducono l'espressione genica. Negli ultimi anni, la deregolazione epigenetica è stata associata a reazioni autoimmuni e ad alterazioni della funzione dei linfociti T. In particolare, manifestazioni autoimmuni della SM sono state collegate a difetti nella regolazione epigenetica.

Scopo di questo progetto era verificare se un controllo epigenetico aberrante nei linfociti T CD4+ svolga un ruolo patogenico nella SM. In particolare, gli obiettivi specifici del progetto prevedevano di identificare i nodi epigenetici (costituiti da elementi genetici regolatori e geni target) aberranti nelle cellule CD4+ SM, convalidare il contributo di nodi epigenetici aberranti selezionati alla risposta alterata delle cellule CD4+ SM e definire il compartimento cellulare CD4+ più colpito dalle alterazioni.

## RISULTATI

Durante il periodo finanziato abbiamo risposto a tutte le

domande sperimentali previste nella proposta, anche se abbiamo dovuto affrontare problemi legati al limitato accesso ai pazienti per la crisi pandemica e al cambio del piano sperimentale dovuto a risultati inaspettati.

Analizzando lo stato della cromatina nelle cellule T CD4+ SM e sane, abbiamo identificato un numero molto elevato di regioni della cromatina accessibili in modo differenziale. Inaspettatamente, ulteriori analisi hanno rivelato l'inattivazione specifica di elementi genetici regolatori tipici delle cellule T e, più in generale, un'accessibilità complessiva della cromatina fortemente ridotta nelle cellule SM. Ciò indica che lo stato della cromatina nelle cellule T SM è largamente aberrante, osservazione che non è mai stata descritta prima. L'ampiezza dell'aberrazione riscontrata nell'accessibilità della cromatina ci ha indotto a modificare il piano sperimentale originale per caratterizzare meglio l'organizzazione complessiva della cromatina e le sue interazioni nelle cellule CD4+ SM, invece di analizzare singole regioni, come proposto nel progetto originale. A tal fine, abbiamo messo a punto in laboratorio una tecnica di sequenziamento del genoma innovativa e impegnativa, chiamata Hi-C, che consente di definire la conformazione della cromatina nel nucleo cellulare. Utilizzando questa tecnica, abbiamo mappato per la prima volta la struttura 3D della cromatina nei linfociti T CD4+ SM. Quando l'abbiamo confrontata con la mappa definita nei linfociti T CD4+ sani non abbiamo osservato alterazioni macroscopiche, indicando che la conformazione della cromatina è mantenuta nei linfociti T SM. Infine, ab-

biamo condotto studi sulla cromatina su sottopopolazioni di cellule T CD4+ per valutare quale fosse il compartimento più colpito. Sorprendentemente, non abbiamo osservato regioni della cromatina accessibili in modo anomalo negli effettori attivati dall'antigene e nelle cellule regolatorie, ma solo nelle cellule effettrici naïve all'antigene, nei campioni SM rispetto ai campioni sani. Ciò indica che i difetti osservati precedono l'attivazione cellulare e potrebbero quindi essere intrinseci alla cellula. Mappando i nodi epigenetici alterati nelle cellule CD4+ SM naïve ed eseguendo un'analisi di arricchimento genico, abbiamo scoperto che i nodi alterati sono associati a malattie autoimmuni. Inoltre, quando abbiamo mappato i fattori di trascrizione che putativamente controllano i nodi epigenetici alterati nelle cellule SM, abbiamo identificato un nucleo di fattori che sono stati già associati, in studi precedenti, alla SM. Questi risultati propongono i fattori di trascrizione identificati come attori nella patogenesi della SM, verosimilmente controllando la capacità dei linfociti T CD4+ naïve di rispondere in modo infiammatorio allo stimolo antigenico.

## CONCLUSIONI

In questo progetto abbiamo identificato nuove alterazioni epigenetiche nei linfociti T helper CD4+ isolati da persone con SM, determinato la presenza di queste aberrazioni nelle cellule naïve all'antigene e identificato una rete di fattori di trascrizione che possono svolgere un ruolo nell'instaurazione di queste alterazioni. Anche se solo ulteriori studi definiranno ad alta risoluzione la natura delle alterazioni epigenetiche osservate e il ruolo funzionale dei fattori di trascrizione identificati, riteniamo che i risultati ottenuti nel progetto completato gettino nuova luce sui meccanismi molecolari alla base della patologia della SM. Pertanto, i nostri dati aiutano a comprendere meglio l'immunopatogenesi della SM e possono portare a breve termine alla definizione di nuovi meccanismi patogenetici. A lungo termine, i nostri risultati potranno anche aiutare a progettare terapie mirate per curare i pazienti, migliorando così la loro qualità di vita.

# Unraveling the role of aberrant epigenetic hubs in the pathogenic dysregulation of CD4+ T cells in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) pathogenesis has an established autoimmune origin, triggered by autoreactive lymphocyte (CD4+ helper T cell) activation and infiltration in the central nervous system. Although deeply studied, the molecular mechanisms causing MS autoimmunity, including intrinsic defects in the CD4+ effector subset and the relative contribution of regulatory CD4+ compartment, remain mainly obscure. Epigenetics is the machinery that dynamically modifies chromatin (the combination of genomic DNA and proteins) status, making genetic regulatory elements and genes accessible or not to factors that drive gene expression. In the recent years, dysregulation of the epigenetic machinery has been associated with autoimmune reactions and alterations in T cell function. In particular, several lines of evidence link MS autoimmune manifestations to defects in epigenetic regulation.

Aim of this project was to assess if aberrant epigenetic control in CD4+ T cells plays a pathogenic role in MS. In particular, we aimed to identify aberrant epigenetic hubs (nodes of genetic regulatory elements and interacting genes) in total MS CD4+ cells, validate the contribution of selected aberrant epigenetic hubs to the altered MS T cell response and define the subpopulation of MS CD4+ T cells most affected by the alterations.

## RESULTS

During the funded period we have addressed all the experimental matters foreseen in the proposal, even if we have faced some issues linked to the limited access to patients for the pandemic crisis and to the change of experimental plan for some unexpected results.

By analysing chromatin status in MS and healthy CD4+ T cells, we have identified very high numbers of chromatin regions differentially accessible in MS versus healthy cells. Unexpectedly, further analyses revealed specific shut-down of T cell specific genetic regulatory elements and an overall reduced chromatin accessibility in MS cells. This indicates a widely aberrant chromatin accessibility in MS cells, which has never been described before.

The wide aberration in chromatin accessibility found in MS T cells prompted us to modify the original experimental plan to better characterize overall chromatin organization and interactions in MS CD4+ cells instead of analysing single regions, as it was proposed in the original project. To this aim, we set up in the lab an innovative and challenging genome wide sequencing technique, called Hi-C, which allows to define chromatin conformation in the cellular nucleus. By using this technique, we have mapped for the first time the 3D structure of the chromatin in MS CD4+ T cells. When we have compared it



with the structure observed in healthy CD4+ T cells, we have not observed macroscopic alterations, indicating that the overall chromatin conformation is maintained in MS T cells. Finally, we have performed chromatin studies on CD4+ T cell subpopulations, such as antigen-naïve and antigen-experienced effectors, and regulatory cells, to assess what was the most affected compartment in terms of chromatin alterations. Surprisingly, we did not observe aberrantly accessible chromatin regions in antigen-experienced effectors and regulatory CD4+ T cells, but only in antigen-naïve effector cells in MS compared to healthy samples. This indicates that the defects observed precedes cell activation and may be cell intrinsic. By mapping the altered epigenetic hubs in naïve MS CD4+ cells and performing gene enrichment analysis, we found the altered hubs to be associated to autoimmune diseases. Moreover, when we mapped the transcription factors predicted to control the altered MS epigenetic hubs, we identified a core of factors that were already associated, by different means, to MS pathology. These findings put forth the identified transcription factors as players in MS

pathogenesis, possibly by mediating the ability of naïve CD4+ T cells to respond in an inflammatory manner to antigen priming.

## CONCLUSIONS

We have identified in this project novel epigenetic alterations in MS CD4+ helper T cells, pinpointed these aberrations in antigen-naïve cells, and identified a network of transcription factors that may play a role in the establishment of these alterations. Even if only further studies will define at a high resolution the nature of observed epigenetic alterations and the functional role of identified transcription factors, we believe that the results obtained in the completed project shed new light on the molecular mechanisms underlying MS pathology. Thus, our data help better understanding MS immunopathogenesis and may lead on the short term to the definition of new pathogenic mechanisms. On the long term, our results may also help designing targeted therapies to cure patients, thus improving their quality of life.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Avancini D, Martinelli V, Farina C, Gregori S and Santoni de Sio F. Chromatin analysis reveals immune tolerance-related aberrant epigenetic hubs in T cells from multiple sclerosis patients. Comunicazione a congresso presentata come poster. European Congress of Immunology (ECI), Amsterdam, Netherlands, September 2-5, 2018
- Avancini D, Martinelli V, Fresolone L, Farina, Gregori S and Santoni de Sio F. Chromatin analysis reveals immune tolerance-related aberrant epigenetic hubs in T cells from multiple sclerosis patients. Comunicazione a congresso presentata come poster. EMBO workshop "Chromatin and Epigenetics", Heidelberg, Germany, May 1-4, 2019
- Avancini D, Martinelli V, Volpin M, Merelli I, Montini E, Gregori S and Santoni de Sio F. Epigenetic analysis reveals aberrant chromatin organization in T cells from multiple sclerosis patients. Comunicazione a congresso presentata come poster. EMBL Conference "Transcription and Chromatin", August 27-29, 2020, Virtual
- Avancini D, Martinelli V, Volpin M, Merelli I, Montini E, Gregori S and Santoni de Sio F. Epigenetic analysis reveals aberrant chromatin organization in T cells from multiple sclerosis patients. Comunicazione a congresso presentata come poster. European Congress of Immunology (ECI), September 1-4, 2021, Virtual

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 190.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 190,000

# Proprietà soppressive delle cellule regolatorie di tipo 1 (Tr1) in risposta a cellule T patogene nella sclerosi multipla



## Jens Geginat

*Istituto Nazionale di Genetica Molecolare e Dipartimento di scienze cliniche e di comunità.  
Università degli studi di Milano, Milano, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Nadia Pulvirenti, Chiara Maria Vasco, Maria Cristina Crosti, Lucia Sarnicola**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Elio Scarpini, Daniela Galimberti, Anna Pietroboni, Milena de Riz, Centro Sclerosi Multipla, IRCCS Ca' Granda, Policlinico di Milano Ospedale Maggiore, Milano, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria del sistema nervoso centrale (SNC). Le cellule T regolatorie (Treg e Tr1) sono cellule immunitarie specializzate che inibiscono l'infiammazione producendo il mediatore interleuchina-10 (IL-10): queste cellule sono promettenti per lo sviluppo di nuovi trattamenti per la SM, ma è necessario comprenderne meglio i ruoli. La secrezione di IL-10 da parte dei linfociti T richiede l'attivazione mediata dall'interazione con antigeni: nella SM essi possono essere endogeni come la mielina che ricopre gli assoni dei neuroni, o esogeni, come il virus Epstein-Barr (EBV), un virus persistente che nella SM rappresenta un noto fattore di rischio. Lo scopo di questo progetto era di capire il ruolo delle cellule Tr1 nella SM e di identificare gli antigeni in grado di indurre la produzione di IL-10 nel SNC. Essendo impossibile l'analisi delle cellule immunitarie direttamente nel cervello di pazienti con SM, abbiamo analizzato le cellule migrate nel liquido cefalorachidiano (LCR). Inoltre abbiamo confrontato il sangue di pazienti trattati e non trattati con natalizumab, un farmaco che impedisce alle cellule immunitarie di migrare nel SNC, rendendole disponibili all'analisi nel sangue.

## RISULTATI

Abbiamo monitorato le cellule Tr1 in pazienti SM e in individui sani. Le Tr1 erano significativamente ridotte nel sangue di pazienti non trattati ma mostravano un'aumentata proliferazione. Questi cambiamenti erano selettivi per le Tr1 e non sono stati osservati nei pazienti trattati con natalizumab, suggerendo che la migrazione delle Tr1 nel SNC

sia responsabile di queste alterazioni. Inoltre, le Tr1 erano fortemente arricchite nel LCR. Abbiamo confrontato la capacità delle Tr1 di produrre mediatori solubili, mostrando che nei pazienti le Tr1 producevano quantità maggiori di IL-10 e quantità inferiori di mediatori pro-infiammatori rispetto ai sani. Inoltre, le Tr1 nel LCR producevano più IL-10 rispetto alle Tr1 nel sangue degli stessi pazienti. Non abbiamo potuto sequenziare l'RNA dei linfociti T presenti nel LCR di pazienti SM per via dei costi molto alti rispetto al finanziamento ottenuto (-25%) e a causa del numero limitato di cellule ottenute dal LCR di 5 pazienti. Inoltre l'analisi mirava a identificare geni coinvolti in un loro presunto difetto funzionale, che però non è stato confermato dai nostri risultati. Siamo riusciti però a identificare quali antigeni fossero in grado di attivare le Tr1 a produrre IL-10, mettendo a punto una nuova metodica che permette di analizzare la specificità antigenica di linfociti T anche in campioni esigui di sangue. Gli antigeni derivati dalla mielina attivavano debolmente i linfociti T pro-infiammatori, ma non riuscivano ad attivare le Tr1. Al contrario, gli antigeni derivati da EBV attivavano le Tr1, e questa attivazione era più marcata nei pazienti SM, in particolare in quelli trattati con natalizumab. Abbiamo identificato una singola proteina virale, EBNA-1, che risultava molto efficiente nell'attivare le Tr1 nei pazienti SM, inducendo anche la produzione di IL-10.

## CONCLUSIONI

Il fatto che le frequenze e tassi di proliferazione delle cellule Tr1 erano selettivamente alterati nei pazienti, suggerisce che fossero coinvolte nella SM. L'arricchimento del-

le Tr1 nel LCR e gli effetti del Natalizumab suggeriscono inoltre che esse siano trattenute e attivate nel SNC. Le Tr1 producevano livelli molto alti di IL-10, in particolare in pazienti SM trattati con natalizumab e nel LCR. Questi risultati indicano che le Tr1 possono svolgere un ruolo benefico nella fase acuta della SM, inibendo l'infiammazione e i danni al SNC.

L'analisi delle specificità antigeniche delle Tr1 ha rivelato che esse sono però attivate dall'antigene "sbagliato" (EBV/EBNA-1). Questo implica che l'effetto benefico delle Tr1 nel SNC è limitato ai siti in cui sono presenti cellule infette da EBV. In conseguenza, l'inibizione delle cellule T pro-infiammatorie, mielina-reattive, ritenute responsabili della progressione della malattia, è indiretta e sub-ottimale. Inoltre, le Tr1 inibiscono anche il controllo di EBV da parte del sistema immunitario nella fase di remissione. È stato

ipotizzato che EBV non è solo un fattore di rischio nell'insorgenza della SM, ma abbia anche un ruolo importante nelle ricadute e nella progressione. In questo scenario, le Tr1 avrebbero a lungo termine un ruolo dannoso, poiché aiuterebbero EBV a persistere e quindi a innescare nuove ricadute.

In conclusione, il nostro studio ha identificato un nuovo protagonista cellulare chiave nella SM, e contribuisce a migliorare la nostra comprensione della complessa patogenesi. Le Tr1 sembrano essere promettenti per future terapie cellulari, anche se le Tr1 specifiche per EBNA-1 presenti nei pazienti sembrano purtroppo inadatte. Le future terapie dovrebbero mirare a indurre delle Tr1 mielina-specifiche in grado di inibire efficientemente i danni al SNC senza inibire il controllo di EBV.

## Suppression of pathogenic T-cell responses by type 1 regulatory T-cells (Tr1) in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is due to a detrimental inflammation of the central nervous system (CNS). There are specialised immune cells that inhibit inflammation by secreting the anti-inflammatory mediator Interleukin-10 (IL-10), called regulatory T-cells. There are two different types of regulatory T-cells, called "Tregs" and "Tr1s". They hold the promise for future treatments of MS, but their roles in MS need first to be better understood. In particular, the role of Tr1s is understudied. The secretion of IL-10 requires activation by molecules called antigens, that could be either derived from endogenous self-proteins that form the protective myelin sheath of neurons or from exogenous viruses that are well-known risk factors in MS, like the persistent Epstein-Barr Virus. The aim of this project was to understand the role of Tr1s in MS, and to identify antigens that can induce IL-10 production in the CNS. Since analysing immune cells directly in the brain or the CNS of MS patients is impossible, we have analysed cells in the cerebrospinal fluid (liquor, CSF), which contains immune cells that migrated to the CNS. Moreover, we have compared untreated MS patients to those treated with natalizumab, because the latter blocks immune cells that migrate to the CNS in the circulation.

### RESULTS

We have first monitored if Tr1s were altered in MS as compared to healthy individuals. Tr1s were significantly reduced in the blood of untreated MS patients, but showed increased proliferation. These changes were selective for Tr1s and were not observed in patients treated

with natalizumab, suggesting that migration of Tr1s to the CNS was responsible. Consistently, Tr1s were strongly enriched in the CSF. We next compared the capacities of Tr1s to produce soluble mediators. In MS patients, Tr1s produced higher amounts of the anti-inflammatory mediator IL-10 and lower amounts of pro-inflammatory mediators as compared to healthy individuals. Moreover, Tr1s in the CSF produced higher amounts of IL-10 as compared to Tr1s in the blood of the same patients. We were unable to perform RNA sequencing of T-cells from the CSF of MS patients, because these experiments are expensive, and the requested budget was cut by 25%. Moreover, the obtained cell numbers from the CSF of five patients were too low. However, this analysis was aimed to identify genes involved in a presumed functional defect of Tr1-cells in MS, but Tr1 were fully functional. We succeeded however to identify antigens that activated Tr1s to produce IL-10. These experiments are technically very difficult, but we were able to develop -specifically for this project- a new assay that allowed us to analyse the antigen specificities of Tr1s even in a small amount of blood. Myelin-derived antigens weakly activated pro-inflammatory helper T-cells, but largely failed to activate Tr1s. In contrast, Epstein-Barr virus-derived antigens activated Tr1s, and this activation was stronger in MS patients, in particular in those treated with natalizumab. We also identified a single viral protein, named EBNA1, which was very efficient in activating Tr1s in MS patients. Finally, we were also able to show EBV-induced IL-10 production by Tr1-cells.

## CONCLUSIONS

The altered frequencies and proliferation rates of selectively Tr1s suggest that they are involved in MS. The enrichment of Tr1s in the CSF and the effects of natalizumab suggests that Tr1s are retained and activated in the CNS. Furthermore, Tr1s, which produce already very high levels of IL-10 in healthy individuals, produced even higher levels in MS patients, in particular in the CNS. Altogether, these results indicate that Tr1s could play a key beneficial role by inhibiting inflammation and CNS damage in the acute phase.

However, the analysis of the antigen specificities of Tr1s unveiled that they were activated by the “wrong” antigen (EBNA1/EBV). This implies that the beneficial effect of Tr1s in the CNS is restricted to sites where EBV-infected cells are present. Thus, the inhibition of pro-inflammatory, myelin-reactive T-cells is indirect and sub-optimal.

Moreover, Tr1s inhibit the control of EBV by the immune system in the remission phase. EBV is a well-established risk factor to develop MS, but it was also proposed that it promotes relapses and disease progression. In this scenario, Tr1s play in the long run a detrimental role, since they inhibit the anti-EBV immune response and thus promote future relapses.

In conclusion, our study identified a new key cellular player in MS, and it also substantially contributes to improve our understanding of the complex pathogenesis. Moreover, Tr1-cells seem to be promising for cellular therapies of MS, although the naturally occurring EBNA1-specific Tr1s are unfortunately not well-suited. Rather, the goal of future therapies should be to induce myelin-reactive Tr1s, which would inhibit CNS damage efficiently without inhibiting the control of EBV.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Congresses

- Pulvirenti N, Pietroboni A, De Riz M, Vasco C, Scarpini E, Geginat J. Analysis of Eomes+Tr1-like cells in multiple sclerosis XXIX Annual Congress AINI (Associazione italiana Neuroimmunologia), 18 September 2021, Verona
- Geginat J. Antigen specificities of T cell subsets unveils their roles in multiple sclerosis. V Congress ISCCA (Italian Society for Cytometric Cell Analysis), Online 20 May 2021

### Publications in preparation

- Pulvirenti N, Vasco, De Riz M, Pietroboni A, Galimberti D, Scarpini E, Geginat J. Title/Journal to be defined
- Geginat J et al. Review on Eomes+Tr1-like cells in human diseases for Eur J Immunol

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 3 anni (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 200.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 3 years (extended by 3 months) and the amount of € 200,000

# Ruolo di TREM2 nella modulazione della microglia durante demielinizzazione nel sistema nervoso centrale



## Laura Piccio

*Department of Neurology, Washington University in St. Louis, School of Medicine, St. Louis, MO, US*

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Claudia Cantoni, Fabia Filipello, Laura Ghezzi, Bryan Bollman, Robert Mikesell, Alberto Locca**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da un danno immuno-mediato agli oligodendrociti e alla mielina. I precursori oligodendrocitari si trovano nelle lesioni della sclerosi multipla e possono potenzialmente maturare per rigenerare la mielina, però la rimielinizzazione fallisce o è incompleta nella SM per ragioni che sono per la gran parte ancora sconosciute. Sappiamo che la rimozione efficiente dei detriti mielinici nel tessuto è una condizione necessaria perché possa avvenire la remielinizzazione. Le lesioni di SM attive nel SNC sono caratterizzate dalla presenza di microglia attivata, cellule implicate nella rimozione di materiale mielinico una volta che la mielina è stata danneggiata. La microglia risponde rapidamente a un danno tissutale assumendo una forma attivata con spiccate funzioni fagocitarie. I meccanismi molecolari che portano all'attivazione della microglia non sono ancora completamente chiari. Il recettore "Triggering receptor expressed on myeloid cells 2" (TREM2) è espresso selettivamente dalla microglia nel SNC. Mutazioni del gene codificante per TREM2 che portano alla sua mancata funzione causano nell'uomo una malattia classificata tra le leucodistrofie e caratterizzata clinicamente da demenza presenile. Varianti genetiche di TREM2 (che non causano una completa perdita della sua funzione) sono associate a un aumentato rischio di diverse patologie neurodegenerative. Queste evidenze suggeriscono il ruolo critico di TREM2 nel modulare le funzioni della microglia. In studi già pubblicati, abbiamo dimostrato che topi geneticamente mancanti per TREM2 (indicati come topi Trem2<sup>-/-</sup>) presentavano un significativo difetto nella risposta micro-

gliale al danno mielinico incluso un difetto di attivazione, ridotta proliferazione e ridotta degradazione dei detriti di mielina causando di conseguenza una più profonda demielinizzazione nel SNC. La microglia da topi Trem2<sup>-/-</sup> mostrava anche un accumulo intracellulare di fagosomi e ridotta espressione dell'enzima lipoprotein lipase (LPL), un gene target del fattore di trascrizione chiamato "peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$ ", che regola molti geni coinvolti nel metabolismo lipidico. Questo progetto si proponeva 3 obiettivi principali.

L'Obiettivo 1 era quello di studiare i meccanismi di fagocitosi e di degradazione di materiale lipidico da parte della microglia mediati da TREM2 usando dei modelli in vitro. L'Obiettivo 2 era di valutare gli effetti della attivazione di TREM2 sulla degradazione di detriti mielinici in vivo nel modello di demielinizzazione indotta attraverso la somministrazione di cuprizon. In questa parte della ricerca abbiamo anche studiato il ruolo dell'enzima LPL e del fattore di trascrizione PPAR $\alpha$  in questi meccanismi di smaltimento dei frammenti di mielina danneggiata. Nell'Obiettivo 3, abbiamo valutato l'espressione di TREM2 in tessuti ottenuti post-mortem da persone con la SM per poter comprendere meglio la possibile funzione di TREM2 nel SNC. Lo scopo di questa proposta è quella di migliorare la nostra comprensione del ruolo di TREM2 nelle funzioni della microglia e porre le basi di nuove opzioni terapeutiche per le malattie demielinizzanti del SNC che favoriscano la remielinizzazione.

### RISULTATI

Per raggiungere gli Obiettivi proposti in questo progetto abbiamo condotto esperimenti in vitro, studi in vivo in

modelli preclinici di malattia e studi che hanno utilizzato tessuti umani ottenuti da autopsie di persone con sclerosi multipla oppure persone con altre patologie non neurologiche. Negli esperimenti in vitro abbiamo studiato l'internalizzazione della mielina e la sua degradazione da parte di macrofagi e microglia isolati da topi controllo (detti wild type, WT) e Trem2<sup>-/-</sup>. Abbiamo dimostrato che la microglia e i macrofagi da topi Trem2<sup>-/-</sup> sono in grado di internalizzare e degradare la mielina anche se più lentamente rispetto alla microglia e macrofagi da topi controllo. In particolare, la microglia isolata ex vivo da topi Trem2<sup>-/-</sup> dopo 4 settimane di trattamento con il cuprizone presentava un mancato aumento dell'espressione a livello di mRNA e proteina della lipoprotein lipase (LPL), un enzima implicato nel metabolismo dei lipidi. È interessante notare che il difetto osservato nella degradazione della mielina nei topi Trem2<sup>-/-</sup> potrebbe essere dovuto alla ridotta espressione di questo enzima. Per questo motivo abbiamo generato topi geneticamente modificati in modo da non esprimere LPL solo nella microglia e abbiamo indotto demielinizzazione nel SNC attraverso la somministrazione del cuprizone. Le analisi sono state fatte nel corpo calloso con studi di immunohistochimica e hanno dimostrato un fenotipo più severo in topi mancanti di LPL con un maggiore accumulo di detriti mielinici rispetto ai topi controllo WT. Questo suggerisce un ruolo critico di LPL in questo processo. Stiamo pianificando altri esperimenti per chiarire il ruolo dell'enzima LPL nel modello preclinico di demielinizzazione indotto con il cuprizone.

In studi condotti come parte di questo progetto abbiamo testato gli effetti di un nuovo anticorpo monoclonale diretto contro TREM2 nel modello di demielinizzazione del SNC indotto con cuprizone. Abbiamo dimostrato che questo anticorpo ha un'azione agonista e attivante sul recettore TREM2 espresso dalla microglia. Il trattamento con

questo anticorpo TREM2 agonista ha favorito la rimozione di detriti mielinici dopo demielinizzazione nel SNC. Gli effetti mediati dal trattamento con l'anticorpo includevano un'aumentata internalizzazione e degradazione della mielina che risultavano in aumentata rimozione di detriti mielinici da parte della microglia. Inoltre, è importante notare che l'attivazione di TREM2 mediata dal trattamento con l'anticorpo si associava a un aumentato numero di precursori oligodendrocitari nelle aree di demielinizzazione e anche aumentato numero di oligodendrociti maturi, maggiore remielinizzazione e integrità degli assoni. Questi risultati sono molto rilevanti perché identificano TREM2 espresso dalla microglia come un potenziale nuovo target molecolare per promuovere la remielinizzazione nel SNC. In studi che hanno utilizzato tessuti umani post-mortem abbiamo dimostrato che TREM2 è molto espresso a livello di trascritto in macrofagi che stanno attivamente fagocitando mielina in aree di lesioni attive nel SNC di persone con la SM. Inoltre studi di espressione genica hanno anche dimostrato un difetto dei meccanismi di fagocitosi in persone con la malattia di Nasu-Hakola, una malattia genetica in cui il gene TREM2 è mutato e il recettore TREM2 non è funzionante.

## CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca hanno portato all'identificazione di TREM2 come un recettore con un ruolo chiave nei meccanismi molecolari che portano all'attivazione della microglia e per diverse sue funzioni. Queste ultime includono la fagocitosi della mielina, la sua degradazione e in generale il metabolismo lipidico nella cellula. Inoltre, i nostri studi sono rilevanti perché suggeriscono che TREM2 sulla microglia possa essere un nuovo potenziale target farmacologico per promuovere la remielinizzazione nelle malattie demielinizzanti del SNC.

# Role of TREM2 in modulating microglia function during CNS demyelination

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) characterized by immune-mediated damage to oligodendrocytes and myelin. Oligodendrocyte precursor cells are found in MS lesions and can potentially mature to regenerate myelin, but remyelination fails or is incomplete in MS for reasons that are mainly unknown. Efficient removal of myelin debris is a prerequisite to remyelination. Active MS lesions are characterized by the presence of activated microglia, which are implicated in removal of myelin debris. Microglia respond to tissue injury by rapid transformation

to an activated form with phagocytic functions. The molecular changes that occur in microglia during their activation are incompletely understood. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) is selectively expressed by microglia in the CNS. TREM2 loss-of-function mutations in humans cause a leukodystrophy with presenile dementia, while TREM2 genetic variants confer increased risk of several neurodegenerative diseases. This evidence underlies the critical role of TREM2 in microglia biology. In published studies, we showed that TREM2 deficient (Trem2<sup>-/-</sup>) mice have broad defects in microglial responses to myelin damage including defective activation, reduced proliferation,



and impaired myelin clearance, resulting in more profound CNS demyelination. Trem2<sup>-/-</sup> microglia also exhibited accumulation of myelin-containing phagosomes and reduced expression of the enzyme lipoprotein lipase (LPL), a target gene of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$ , which regulates genes implicated in lipid metabolism.

This proposal had three main objectives. In Aim 1, we planned to determine the mechanism of TREM2-mediated microglial phagocytosis and lipid debris clearance by using in vitro systems. In Aim 2 we evaluated the effects of TREM2-mediated microglia activation and myelin debris clearance in vivo in a toxin-mediated model of CNS demyelination. The role of LPL and PPAR $\alpha$  in these events were studied. In Aim 3, we evaluated TREM2 expression in MS post-mortem tissues to gain insights into TREM2 functions. The goal of this proposal was to strengthen our understanding of microglia and TREM2 biology and to lay the foundation of new therapeutic options for demyelinating diseases favoring remyelination.

## RESULTS

To accomplish the objectives of the proposed project we have performed in vitro experiments, in vivo studies in pre-clinical models and studies using human tissues obtained from autopsies of people with MS and control subjects with non-neurological conditions. In in vitro experiments we have studied myelin uptake and degradation by macrophages and microglia isolated from normal wild type (named WT) and Trem2<sup>-/-</sup> mice. We have demonstrated that Trem2<sup>-/-</sup> microglia and macrophages can uptake and degrade myelin even if at a slower pace compared to WT microglia. Notably, microglia isolated ex vivo from Trem2<sup>-/-</sup> mice at 4 weeks after treatment with cuprizone failed to upregulate expression at the mRNA and protein level of LPL, an enzyme implicated in lipid metabolism. The defect in myelin degradation observed in Trem2<sup>-/-</sup> mice could be related to lack of this enzyme. Therefore, we generated

mice genetically deficient for LPL only on microglia and we induced demyelination with cuprizone. Analyses were performed in the corpus callosum by immunohistochemistry and demonstrated a more severe phenotype in mice lacking LPL with significant more accumulation of myelin debris compared to wild type mice, suggesting a critical role of LPL in this process. Future studies are planned to better clarify the role of LPL in the cuprizone preclinical model.

As part of this project, we have tested a newly generated monoclonal antibody against TREM2 in the cuprizone model of CNS demyelination. This antibody was demonstrated to have activating effects on the receptor TREM2. Treatment with this TREM2 agonistic antibody promoted the clearance of myelin debris after CNS demyelination. Effects included enhancement of myelin uptake and degradation, resulting in accelerated myelin debris removal by microglia. Most importantly, antibody dependent TREM2 activation on microglia was associated with increased density of oligodendrocyte precursors in areas of demyelination, as well as formation of mature oligodendrocytes, enhanced remyelination and axonal integrity. These results are relevant as they propose TREM2 on microglia as a potential new target to promote remyelination.

In human studies we demonstrated that TREM2 was highly expressed at transcript level on myelin-laden phagocytes in active demyelinating lesions in the CNS of subjects with MS. Gene expression studies have shown that macrophages from subjects with TREM2 genetic deficiency displayed a defect in phagocytic pathways.

## CONCLUSIONS

The results of our research identify TREM2 as a key molecule in microglia activation and for several of their functions including myelin phagocytosis, clearance and in general lipid metabolism. Furthermore, they are relevant as they propose TREM2 on microglia as a potential new target to promote remyelination in CNS demyelinating diseases.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Suárez-Calvet M, Capell A, Araque Caballero MÁ, Morenas-Rodríguez E, Fellerer K, Franzmeier N, Kleinberger G, Eren E, Deming Y, Piccio L, Karch CM, Cruchaga C, Paumier K, Bateman RJ, Fagan AM, Morris JC, Levin J, Danek A, Jucker M, Masters CL, Rossor MN, Ringman JM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner M, Ewers M, Haass C; Dominantly Inherited Alzheimer Network; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. CSF progranulin increases in the course of Alzheimer's disease and is associated with sTREM2, neurodegeneration and cognitive decline. *EMBO Mol Med*. 2018;10(12)
- Deming Y, Filipello F, Cignarella F, Cantoni C, Hsu S, Mikesell R, Li Z, Del-Aguila JL, Dube U, Farias FG, Bradley J, Budde J, Ibanez L, Fernandez MV, Blennow K, Zetterberg H, Heslegrave A, Johansson PM, Svensson J, Nellgård B, Lleo A, Alcolea D, Clarimon J, Rami L, Molinuevo JL, Suárez-Calvet M, Morenas-Rodríguez E, Kleinberger G, Ewers M, Harari O, Haass C, Brett TJ, Benitez BA, Karch CM, Piccio L, Cruchaga C. The MS4A gene cluster is a key modulator of soluble TREM2 and Alzheimer's disease risk. *Sci Transl Med*. 2019 Aug 14;11(505). pii: eaau2291
- Suárez-Calvet M, Morenas-Rodríguez E, Kleinberger G, Schlepckow K, Araque Caballero MÁ, Franzmeier N, Capell A, Fellerer K, Nuscher B, Eren E, Levin J, Deming Y, Piccio L, Karch CM, Cruchaga C, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner M, Ewers M, Haass C; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Early increase of CSF sTREM2 in Alzheimer's disease is associated with tau related-neurodegeneration but not with amyloid- $\beta$  pathology. *Mol Neurodegener*. 2019 Jan 10;14(1):1.
- Cignarella F, Filipello F, Bollman B, Cantoni C, Locca A, Mikesell R, Manis M, Ibrahim A, Deng L, Benitez BA, Cruchaga C, Licastro D, Mihindikulasuriya K, Harari O, Buckland M, Holtzman DM, Rosenthal A, Schwabe T, Tassi I, Piccio L. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance in a model of CNS demyelination. *Acta Neuropathol*. 2020 Oct;140(4):513-534.
- Schindler SE, Cruchaga C, Amulya Joseph A, McCue L, Farias FHG, Henson R, Deming Y, Mikesell RJ, Wilkins CH, Llibre-Guerra J, Moulder KL, Piccio L, Fagan AM, Wisch JK, Ances BM, Benzinger TLS, Xiong C, Holtzman DM, Morris JC,\* for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative African Americans Have Differences in CSF Soluble TREM2 and Associated Genetic Variants *Neurol Genet*. 2021 Mar 4;7(2):e571
- Filipello F, Goldsbury C, You SF, Locca, Karch CM, Piccio L. Soluble TREM2: innocent bystander or active player in neurological diseases? *Neurobiology of Diseases*- 2022 Jan 15;165:105630. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105630. Online ahead of print.

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per un periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di € 106,000**

Research project funded by FISM Grant for the period of 2 years (extended by 1 year) and the amount of € 106,000



# Impatto del digiuno a giorni alterni in un modello murino di sclerosi multipla



## Valeria Tosti, Laura Ghezzi

Department of Neurology, Washington University in St. Louis, School of Medicine, St. Louis, MO, US

MENTORE/MENTOR  
**Laura Piccio**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia a eziologia sconosciuta caratterizzata da infiammazione del sistema nervoso centrale (SNC), demielinizzazione e danno assonale. L'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA) è il principale modello animale per la SM, ed è stato determinante per lo sviluppo di diversi farmaci. Le risposte autoimmuni durante l'ESA sono modulate da cellule T regolatorie (Tregs). L'esposizione ad alcuni fattori ambientali tra cui la dieta e l'obesità influenzano il rischio di sviluppare la SM. Recentemente diversi studi hanno dimostrato che l'obesità in bambini/giovani adulti conferisce un aumentato rischio di sviluppare la SM. I meccanismi biologici che correlano obesità e SM non sono però ancora noti.

Abbiamo precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio che un regime di restrizione calorica (RC) è in grado di migliorare l'ESA. Un approccio alternativo alla RC, ma con effetti metabolici simili è il digiuno a giorni alterni o digiuno intermittente (DI), che potrebbe essere più facile da proporre ai pazienti. I nostri dati mostrano che un regime di DI migliora il decorso clinico di topi con ESA rispetto a topi controllo. Il DI è stato associato ad un aumentato numero di Treg e a cambiamenti nel microbioma intestinale. Al momento, abbiamo poche informazioni circa l'interazione tra il microbioma intestinale e la dieta in patologie autoimmuni come la SM/ESA.

La dieta svolge sicuramente un ruolo fondamentale nel determinare la composizione del microbioma intestinale, che, a sua volta, è in grado di modulare il sistema immunitario dell'ospite. I batteri presenti nell'intestino e i loro prodotti metabolici possono influenzare il sistema immunitario in senso sia pro-infiammatorio sia immuno-regolatorio, con un conseguente effetto favorente o protettivo nei confronti dello sviluppo di malattie autoimmuni. La RC prolungata nei topi determina un aumento dell'abbondanza di Lactobacilli intestinali, che è stato associato a un incremento della durata della vita. I nostri dati, ottenuti da

topi sottoposti a trapianto di materiale fecale derivante da topi in DI, hanno dimostrato una ridotta incidenza e severità dell'ESA rispetto ai topi controllo. Abbiamo quindi ipotizzato che i cambiamenti nella composizione del microbioma intestinale osservati in topi sottoposti a DI non siano solo una risposta al cambiamento della dieta, ma agiscano da mediatore nell'effetto protettivo di quest'ultima nei confronti dell'ESA.

Oltre all'effetto immunomodulatorio, il microbioma intestinale è anche in grado di influenzare il metabolismo dell'ospite. Prodotti metabolici del microbioma intestinale, come gli acidi grassi a catena corta (AGACC indicati con la sigla dall'inglese SCFA) sono in grado di regolare la funzione degli adipociti e, di conseguenza, la produzione di adipochine, quali leptina e adiponectina. Gli AGACC derivano dalla fermentazione batterica di carboidrati non digeriti presenti nell'ultimo tratto dell'intestino, il colon. Gli SCFA modulano la produzione di adipochine tramite l'interazione con un recettore accoppiato alla proteina G (GPCR), GPR41. L'obiettivo di questo progetto è quello di caratterizzare il beneficio del DI in topi con ESA esplorando il collegamento tra alterazione della composizione del microbioma intestinale e modulazione del sistema immunitario.

Come primo obiettivo di questa ricerca abbiamo analizzato gli effetti del microbioma intestinale, post modificazioni indotte dal DI, sulla via di segnale SCFA-GPR41-leptina nella ESA. Abbiamo eseguito una serie di esperimenti per caratterizzare questa via di segnale in topi sottoposti a DI e in cui è stata indotta la ESA.

Nel secondo obiettivo di questo progetto abbiamo testato l'ipotesi che in topi con ESA in un regime di DI, non l'intero microbiota, ma solamente la porzione più rappresentativa sia quella responsabile di trasferire le diverse proprietà benefiche. In particolare, ipotizziamo che sia questa frazione di microbiota quella in grado di alterare l'attività delle cellule del sistema immunitario e di sopprimere l'ESA.

Questo studio farà luce sulle complesse interazioni tra dieta, flora intestinale, adipochine e sistema immunitario al fine di dimostrare che manipolando fattori dietetici è possibile regolare positivamente le risposte immunitarie. I nostri studi sono clinicamente rilevanti perché il DI è efficace nel modello animale di SM, e cercare di capire più nel dettaglio come questo avvenga potrà aiutare nel proporre il DI come trattamento in pazienti con SM da utilizzare in aggiunta agli attuali farmaci immunomodulanti.

## RISULTATI

Nel primo obiettivo abbiamo ipotizzato che il DI, modificando la composizione del microbioma intestinale, moduli la via SCFAs-GPR41-leptina. Per verificare la nostra ipotesi abbiamo randomizzato 30 topi C57BL/6 in due differenti gruppi: un gruppo sottoposto a DI per 4 settimane prima dell'induzione dell'ESA e un gruppo in dieta libera (ad libitum - AL). I topi sottoposti a DI hanno sviluppato un'ESA meno severa e caratterizzata da un esordio più tardivo paragonato a quanto osservato nei topi AL. Inoltre, i topi nel gruppo DI avevano un minor numero di cellule dendritiche e polimorfonucleati nei linfonodi mesenterici durante ESA. Infine, l'espressione di GPR41 intestinale era aumentata nel gruppo DI in confronto al gruppo AL. Non abbiamo osservato nessuna differenza nei livelli di SCFA tra i due gruppi.

Nel secondo obiettivo abbiamo ipotizzato che il microbioma intestinale isolato da topi sottoposti a DI e poi trapiantato in topi riceventi (precedentemente trattati con antibiotici per eliminare la loro flora intestinale) sia in grado di modulare il sistema immunitario e di prevenire l'ESA nei topi riceventi. Il nostro gruppo ha già dimostrato un aumento dell'abbondanza di Bacteroidaceae, Lactobacillace-

ae e Prevotellaceae in topi sottoposti a 4 settimane di DI. Per dimostrare la nostra ipotesi abbiamo utilizzato un mix di Lactobacilli (*L. Reuteri*, *L. Intestinalis*, *L. Johnsonii*) ottenuti commercialmente (ATCC) o purificati direttamente da topi sottoposti a DI. Trenta topi C57BL/6 sono stati trattati con un mix di antibiotici per una settimana in modo da eliminare la flora batterica intestinale presente. In seguito, i Lactobacilli sono stati inoculati per via orale per una settimana a giorni alterni prima dell'induzione dell'ESA e per un'altra settimana dopo l'immunizzazione. I topi trattati con Lactobacilli hanno sviluppato una malattia più lieve in confronto al gruppo di controllo. Inoltre, nei linfonodi mesenterici dei topi sottoposti al trattamento con Lactobacilli, abbiamo osservato un'aumentata percentuale di cellule T regolatorie.

## CONCLUSIONI

Abbiamo confermato che un regime di DI è in grado di modulare l'andamento clinico dell'ESA, verosimilmente agendo tramite la modificazione della composizione del microbioma intestinale e di conseguenza la modulazione del sistema immunitario. Abbiamo descritto un'aumentata espressione di GPR41 nei tessuti intestinali durante ESA, ma non abbiamo osservato alcuna differenza nei livelli di SCFA tra i due gruppi. È già stato dimostrato che topi GPR41<sup>-/-</sup>, che mancano completamente del recettore GPR41, sono protetti dall'ESA. È possibile che gli effetti che abbiamo osservato non siano correlati all'azione degli SCFA sul recettore GPR41.

Nel nostro secondo obiettivo abbiamo dimostrato come un trattamento con Lactobacilli iniziato prima dell'induzione di ESA sia in grado di modificare il decorso della malattia e di modulare il sistema immunitario dei topi riceventi.

# Impact of Intermittent Fasting on a Mouse Model of multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a complex disease of unknown etiology involving central nervous system (CNS) inflammation, demyelination, and axonal damage. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the prime animal model for MS, a model which was instrumental in the development of several MS drugs. MS risk is impacted by environmental factors, including diet and obesity. Several studies show that obesity during childhood/young adulthood confers increased risk of developing MS. We have previously shown that a regimen of calorie restriction (CR) is able to ameliorate EAE. CR appears to be difficult to maintain in the long-term by most individuals. An alternative approach with similar metabolic effects is intermit-

tent fasting (IF), which is easier to translate to humans. We have shown that a regimen of IF ameliorates EAE clinical course compared to control mice fed ad libitum, without restrictions. IF was associated with increased numbers of T regulatory cells, that have a regulatory function on the immune system, changes in serum levels of adipokines, molecules produced by the adipose tissue with modulatory properties on the immune system, and changes in the gut microbiome.

To date, little is known about the interplay between diet and gut microbiome in immune-mediated diseases including MS/EAE. Diet is a critical determinant of the gut microbial composition, and the gut microbiome modulates host immunity. The gut commensal bacteria and their me-

tabolites have the potential to exert both pro- and anti-inflammatory responses and they can either drive or protect from autoimmune diseases. Long-term CR in mice led to over-representation of *Lactobacillus*, which is positively associated with lifespan.

Our data from mice receiving fecal microbiome transplantation (FMT) of the stool from mice undergoing IF showed reduced incidence and severity of EAE in recipient mice. Therefore, we reason that the gut microbiome could be a mediator of IF-induced protection from EAE.

In addition to immuno-modulation, another central function of the gut microbiome is to regulate host metabolism. Metabolites of the gut microbiome such as short chain fatty acids (SCFAs) can regulate the function of adipocytes, and subsequently affect production of adipokines (i.e. leptin and adiponectin), molecules with a broad range of modulatory effects on the immune system. SCFAs are bacterial fermentation products generated primarily in the colon from undigested dietary carbohydrates. SCFAs can modulate the production of adipokines by binding the G protein-coupled receptor (GPCR) GPR41.

The overall goal of this project was to further characterize the benefit of IF in mice with EAE by exploring its effects on immunomodulatory pathways and gut microbiome.

In Aim 1 we tested the hypothesis that the intermittent fasting-altered gut microbiome modulates the short chain fatty acids (SCFAs)-GPR41-leptin pathway in EAE. We performed a series of experiments starting with characterizing the SCFA-GPR41-leptin pathway in mice undergoing IF during EAE and in FMT recipient mice during EAE.

In Aim 2 we tested the hypothesis that over-represented microbiota isolated from mice undergoing IF are sufficient to alter immune cell activity and suppress EAE in recipient mice that were immunized to induce the disease. First, we proceeded to the identification of taxa of interest by fecal transcriptome sequencing and analysis, then we cultured these taxa of interest and proceeded to taxonomic confirmation. Next, bacteria were individually grown, the different strains were combined and administered to mice immunized to induce EAE. Immunological profiling and the effect on EAE clinical course were analyzed after immunization.

## RESULTS

In Aim 1 we hypothesized that the intermittent fasting-altered gut microbiome modulates the short chain fatty acids (SCFAs)-GPR41-leptin pathway in EAE.

To investigate the influence of intermittent fasting (IF) on the SCFAs-GPR41-leptin pathway, C57BL/6 mice were randomly assigned to undergo either IF (24h fasting-feeding cycles) or fed ad libitum (AL) for 4 weeks. After 4 weeks the mice were immunized to induce EAE. As expected,

mice in the IF group showed a later onset and milder disease course compared to mice in the AL group. Moreover, mice in the IF group showed a lower number of dendritic and polymorphonuclear cells in the mesenteric lymph nodes (MLN) after immunization. In the small intestine, GPR41 expression was higher in the IF compared to the AL group. No significant differences were observed at any time-point in SCFA (pyruvate and butyrate) levels in the stool between the two groups. Leptin levels were measured in the serum and they were significantly decreased in the IF compared to AL fed group.

In Aim 2 we hypothesized that over-represented microbiota isolated from mice undergoing IF can alter immune cell activity and suppress EAE in recipient mice. We previously demonstrated an increase in the abundance of the Bacteroidaceae, Lactobacillaceae and Prevotellaceae microbial families in mice on IF for 4 weeks compared to mice fed AL. In our experiments we tested the effects of Lactobacilli on EAE clinical course. Thirty C57BL/6 mice were pre-treated with a mix of antibiotic for one week. On day 8 post-antibiotic treatment, mice were randomized to receive either PBS or a Lactobacilli mix either commercially available (ATCC) or purified from mice undergoing an IF regimen (*L. Reuteri*, *L. Intestinalis*, *L. Johnsonii* strains). The Lactobacilli mix was administered by gavage every other day for two weeks. After one week of treatment the mice were immunized to induce EAE and the treatment by gavage was continued every other day for another week. Mice treated with the bacterial mixture, either commercial or derived from IF mice, presented a slightly reduced clinical severity compared to control mice. Furthermore, in the MLN the percentages of regulatory T cells were higher in the treatment compared to the control group.

## CONCLUSIONS

We confirmed that IF modulates EAE clinical course and pathology by acting on leptin levels, the immune system and the gut microbiome. Gut microbiome composition is involved in mediating the effect of diet modifications on disease course. We observed higher expression of GPR41 in the small intestine of mice undergoing IF, and no differences in expression were observed in other organs. It has been demonstrated that GPR41 knock-out mice (lacking the GPR receptor) are protected from EAE. GPR41 has a vast list of ligands and could exert both pro and anti-inflammatory effects. It is possible that the observed effect of IF on the SCFA-leptin pathway is independent from the activation of GPR41, since other authors have made similar observations also in GPR41<sup>-/-</sup> mice.

In our Aim 2, we demonstrated that Lactobacilli treatment (mix of different strains) alters EAE course and immune cell activity during EAE.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Fontana L, Ghezzi L, Cross AH, Piccio L. Effects of dietary restriction on neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *J Exp Med* 2021 Feb 1;218(2):e20190086. doi: 10.1084/jem.20190086
- Ghezzi L, Cantoni C, Pinget GV, Zhou Y, Piccio L. Targeting the gut to treat multiple sclerosis. *Clin Invest*. 2021 Jul 1;131(13):e143774. doi: 10.1172/JCI143774
- Shah S, Locca A, Dorsett Y, Cantoni C, Ghezzi L, Lin Q, Bokoliya S, Panier H, Suther C, Gormley M, Liu Y, Evans E, Mikesell R, Obert K, Salter A, Cross AH, Tarr PI, Lovett-Racke A, Piccio L, Zhou Y. Alterations of the gut mycobiome in patients with MS. *ioMedicine*. 2021 Sep;71:103557. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103557. Epub 2021 Aug 26
- Cantoni C, Lin Q, Dorsett Y, Ghezzi L, Liu Z, Pan Y, Chen K, Han Y, Li Z, Xiao H, Gormley M, Liu Y, Bokoliya S, Panier H, Suther C, Evans E, Deng L, Locca A, Mikesell R, Obert K, Newland P, Wu Y, Salter A, Cross AH, Tarr PI, Lovett-Racke A, Piccio L, Zhou Y. Alterations of host-gut microbiome interactions in multiple sclerosis. *EBioMedicine*. 2022 Jan 27;76:103798. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103798. Online ahead of print
- An integrated approach to precision medicine in Multiple Sclerosis. Poster presentation Americas. Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ACTRIMS) Forum. Palm Beach, FL. 27-29 Feb 2020

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 85.000 €**  
Research Fellowship funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years and the amount of € 85,000

# Anticorpi patogenetici diretti contro le cellule che formano mielina in pazienti con sclerosi multipla



## Mariarosaria Santillo

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Vittorio Enrico Avvedimento, Roberto Paternò, Antonio Porcellini Simona Damiano, Paola Giuliano, Rosa Iodice**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è caratterizzata dalla presenza di placche di demielinizzazione a livello della sostanza bianca del sistema nervoso centrale, causa di manifestazioni cliniche neurologiche. La mielina, ovvero il rivestimento lipidico dei processi neuronali, la cui principale funzione è favorire la trasmissione degli impulsi nervosi, è prodotta dagli oligodendrociti. Queste cellule svolgono anche importanti funzioni di supporto metabolico per i neuroni. Nel sistema nervoso centrale sono presenti un certo numero di precursori degli oligodendrociti (OPC) che differenziandosi in oligodendrociti maturi assicurano un continuo processo di ricambio di queste cellule e di formazione di mielina. A livello delle placche di demielinizzazione è stata dimostrata l'esistenza di un blocco della maturazione degli oligodendrociti con importanti conseguenze sulla mielinizzazione e sopravvivenza neuronale. Le nostre ricerche hanno portato alla scoperta della presenza nel siero di persone con sclerosi multipla, di autoanticorpi che hanno come bersaglio gli oligodendrociti, e che ne inibiscono la maturazione necessaria per la formazione di mielina. Questi anticorpi sono diretti contro il recettore della serotonina denominato 5-HT<sub>2A</sub>, presente sulla membrana degli oligodendrociti e coinvolto nella loro maturazione. L'isolamento di questi anticorpi è di fondamentale importanza per studiarne le caratteristiche e individuare molecole in grado di bloccarne gli effetti. Lo scopo del progetto è l'isolamento dal siero di persone con sclerosi multipla degli anticorpi specifici diretti contro il recettore della serotonina presente sugli oligodendrociti e la dimostrazione del loro ruolo nella patogenesi della malattia attraverso lo studio dei loro effetti sulla maturazione di queste cellule.

### RISULTATI

Per isolare dai sieri di persone con SM autoanticorpi diretti contro il recettore 5-HT<sub>2A</sub> della serotonina e stu-

diarne gli effetti biologici, abbiamo utilizzato come esca un peptide denominato His-tag KL18, corrispondente a parte della sequenza di aminoacidi del recettore della serotonina 5-HT<sub>2A</sub> (peptide LYG) cui è agganciata una breve sequenza ripetuta dell'aminoacido istidina (His). Dai sieri dei pazienti con SM e da quelli di persone sane, abbiamo purificato le immunoglobuline (IgG) totali e successivamente da queste, mediante l'utilizzo del peptide His-tag KL18 legato a delle sfere magnetiche abbiamo isolato le IgG specifiche dirette contro il recettore 5-HT<sub>2A</sub> della serotonina. Gli anticorpi specifici sono stati testati per la loro capacità di legare il recettore 5-HT<sub>2A</sub>, mediante test ELISA. Abbiamo osservato che le immunoglobuline specifiche isolate dai sieri di persone con SM, ma non quelle di persone sane, si legano al peptide LYG. Abbiamo anche dimostrato che le immunoglobuline totali isolate da pazienti controllo e da pazienti con altre patologie come emicrania, polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante e lupus eritematoso sistemico, non si legano al peptide. Questi dimostrano che gli anticorpi contro il recettore della serotonina 5HT<sub>2a</sub> sono presenti in maniera specifica nelle persone con SM.

Utilizzando la serotonina, cioè la sostanza che in vivo interagisce con il recettore producendo effetti biologici nelle cellule, abbiamo dimostrato che questa sostanza promuove il processo di maturazione delle cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC). Questa scoperta sostiene l'idea che gli autoanticorpi diretti contro il recettore 5-HT<sub>2A</sub>, bloccando il legame della serotonina al proprio recettore, possono interferire con la maturazione degli oligodendrociti e di conseguenza con la formazione di mielina. Infatti, utilizzando una linea cellulare umana di oligodendrociti, le cellule M03-13, abbiamo dimostrato che le immunoglobuline totali e quelle specifiche dirette contro il recettore 5-HT<sub>2A</sub> isolate dai sieri di persone con SM interferiscono con il normale processo di maturazione degli oligodendro-

citi inibendo la migrazione e la differenziazione di queste cellule.

## CONCLUSIONI

La scoperta e l'isolamento dai sieri di persone con sclerosi multipla, di autoanticorpi specifici diretti contro il recettore della serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, in grado di interferire con le normali funzioni degli oligodendrociti, suggerisce che peptidi come ad esempio il peptide LYG, in grado di bloc-

care il legame degli anticorpi al recettore possano essere utilizzati come nuova e selettiva terapia per combattere la sclerosi multipla. Questi nuovi potenziali strumenti terapeutici non sarebbero rivolti alla modulazione della risposta autoimmune, come le terapie attualmente disponibili, ma in quanto diretti contro autoanticorpi causa della malattia, potrebbero essere in grado di prevenire e/o curare le lesioni da demielinizzazione e i conseguenti danni neurologici.

# Multiple sclerosis pathogenic antibodies targeting myelin forming cells in multiple sclerosis patients

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is characterized by the presence of demyelinated plaques within the white matter of the central nervous system, causing neurological damage. The myelin surrounding nerve cell axons and responsible for the transmission of nerve impulses, is produced by oligodendrocytes. These cells are also metabolic supporters of neurons. At the level of demyelination plaques, it has been demonstrated the existence of an oligodendrocyte differentiation block with important consequences on myelination and neuronal survival. We discovered the presence in the sera of MS people of autoantibodies targeting oligodendrocytes, which inhibit the maturation process of these cells and consequently myelination. These antibodies are directed against the serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub>, present on the oligodendrocyte membranes and necessary for proper myelination. The aim of the project is the isolation of these antibodies from the serum of MS patients and the study of their role in the pathogenesis of the disease by evaluating their effects on the oligodendrocyte functions.

## RESULTS

To isolate from the sera of MS patients' autoantibodies against the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor and to study their biological effects, we used a peptide named His-tag KL18. This peptide corresponds to part of the amino acid sequence of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor (LYG peptide) to which a short-repeated sequence of the amino acid histidine (His) is attached. We purified total immunoglobulins (IgG) from the sera of MS patients and healthy people, and then isolated specific IgG directed against the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor using His-tag KL18 peptide bound to magnetic beads. By ELISA assay, the specific antibodies were tested for their ability to bind the 5-HT<sub>2A</sub> recep-

tor. We observed that specific IgG isolated from MS sera, unlike that from healthy controls, bind to LYG peptide. We also showed that total IgG isolated from control patients and from patients with other diseases such as migraine, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and systemic lupus erythematosus, do not bind to the peptide. These data show that antibodies against the serotonin receptor 5HT<sub>2a</sub> are specifically present in people with MS. We also showed that serotonin, the substance that interacts with the receptor in vivo, promotes the maturation process of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). This finding, supports the idea that autoantibodies directed against the 5-HT<sub>2A</sub> receptor, by blocking the binding of serotonin to its receptor, can interfere with the maturation of oligodendrocytes and consequently with myelin formation. Indeed, using a human oligodendrocyte cell line, M03-13 cells, we showed that total and specific IgG isolated from MS sera directed against the 5-HT<sub>2A</sub> receptor interfere with the normal maturation process of oligodendrocytes by inhibiting the migration and differentiation of these cells.

## CONCLUSIONS

The discovery and the isolation from the sera of people with MS of specific autoantibodies directed against the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor interfering with the oligodendrocytes functions, suggests that peptides such as LYG peptide, that block the binding of antibodies to the receptor, could be used as a new and selective therapy for multiple sclerosis. These new potential therapeutic tools, unlike currently available therapies, are not directed at modulating the autoimmune response, but at targeting disease-causing autoantibodies, thus preventing and/or treating demyelinating lesions and subsequent neurological damage.





## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Damiano S, La Rosa G, Sozio C, Cavaliere G, Trinchese G, Raia M, Paternò R, Mollica MP, Avvedimento VE, Santillo M. 5-Hydroxytryptamine Modulates Maturation and Mitochondria Function of Human Oligodendrocyte Progenitor M03-13 Cells. *Int Mol Sci* 2021 Mar 5;22(5):2621. doi: 10.3390/ijms22052621
- La Rosa G, Damiano S, Giuliano P, Santarpia C, Capozzi S, Sozio C, Santillo M, Paternò R, Avvedimento VE. Autoanticorpi presenti nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla inibiscono la differenziazione degli oligodendrociti. *Giornate Scientifiche 2020 (Poster)*
- Sozio C, La Rosa G, Paternò R, D'Errico A, Accetta R, La Rosa E, Damiano S, Santillo M. La serotonina inibisce la migrazione e la proliferazione degli oligodendrociti attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno. *Giornate Scientifiche 2020 (Poster)*
- Damiano S, La Rosa G, Sozio C, Giuliano P, Capozzi S, Iodice R, Porcellini A, Paternò R, Avvedimento VE and Santillo M. Multiple sclerosis pathogenic antibodies targeting myelin forming cells. *Congresso FISM 2021. (ePoster)*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 1 anno (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 1 years (extended by 9 months) and the amount of € 30,000

---

# **Diagnosi e monitoraggio della malattia**

Diagnosis and monitoring  
of the disease

---



# Il ruolo della connettività cerebrale e di tecniche di machine learning per la predizione del peggioramento clinico e della compromissione cognitiva in pazienti con sclerosi multipla



## Massimo Filippi

Neurology Unit, Neurorehabilitation Unit, Neurophysiology Service, MS Center, Neuroimaging Research Unit, Division of Neuroscience, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Vita-Salute San Raffaele University, Milano, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Maria Assunta Rocca, Paola Valsasina, Carmen Vizzino, Paolo Preziosa**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Diego Sona, Jacopo Tessadori, Muhammad Abubakar Yamin**, Biomedical Imaging Team, Pattern Analysis and Computer Vision Research Line, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è caratterizzata da un'ampia variabilità di sintomi e decorso di malattia. La risonanza magnetica (RM) convenzionale (c) è molto importante per la diagnosi e il trattamento della malattia. Tuttavia, il valore predittivo della RMc per il successivo decorso della SM è basso. Questo è dovuto al fatto che la disabilità nella SM è dovuta soprattutto a un'alterata comunicazione fra diverse regioni cerebrali piuttosto che al danno focale regionale.

L'analisi di network strutturali e funzionali tramite RM è promettente per comprendere l'alterata comunicazione fra regioni e per darci informazioni clinicamente rilevanti. Le tecniche di machine learning forniscono algoritmi capaci di imparare schemi dai dati forniti, senza bisogno di interpretazione umana a priori.

A fronte di queste premesse, lo scopo di questo progetto è stato di applicare un'analisi di network a dati RM strutturali e funzionali in diversi dataset di pazienti con SM, per testare come le misure di network, combinate al machine learning, fossero in grado di studiare la riorganizzazione strutturale e funzionale, di stimarne la correlazione con misure di disabilità clinica e cognitiva, e di valutarne il valore predittivo per il peggioramento di malattia a medio termine.

## RISULTATI

Il nostro progetto si è composto di tre esperimenti. Nell'Esperimento 1, abbiamo derivato network strutturali e funzionali da 233 pazienti con SM e 77 controlli e testato la predizione del peggioramento clinico dopo 6,4 anni. Al follow-up, 105 pazienti (45%) erano peggiorati clinicamente e 26 pazienti con SM recidivante remittente (RR) erano evoluti a SM secondariamente progressiva (SP). L'analisi random forest ha identificato come predittori del peggioramento clinico una più alta disabilità basale, un più basso volume cerebrale e di sostanza grigia, una diminuita connettività funzionale fra default mode network e un'aumentata connettività funzionale nel networks sensorimotorio, insieme all'atrofia nel network fronto-parietale (accuratezza=0,74). Predittori della conversione a SMSP erano invece una più alta disabilità basale e l'atrofia della sostanza grigia e del network sensorimotorio (accuratezza=0,84). All'analisi ROC, l'inclusione di misure RM di network ha migliorato la predizione di entrambi gli outcome.

Nell'Esperimento 2, abbiamo derivato network strutturali e funzionali da un secondo dataset di 113 pazienti con SM e 46 controlli, ed abbiamo visto come un'opportuna codifica di questi network, insieme ad algoritmi support vector machine (SVM) riuscisse a classificare i pazienti in

fenotipi e a predire il peggioramento clinico dopo 5,2 anni. Al follow-up, 54 pazienti (48%) erano peggiorati clinicamente e 14 SMRR (22%) erano evoluti a SMSP. Gli algoritmi SVM hanno classificato i pazienti SMRR rispetto ai controlli con un'accuratezza=72.5%, i pazienti progressivi rispetto ai controlli con accuratezza=85.2% e i pazienti progressivi dagli SMRR con accuratezza=76%. Usando la connettività dinamica, la classificazione fra controlli e pazienti progressivi aveva un'accuratezza >0.75 e quella fra pazienti SMRR e SMSP di  $\approx 0.63$ . Un adattamento dell'analisi SVM ai network strutturali ha classificato i pazienti SMRR rispetto ai controlli con accuratezza=62%, i pazienti progressivi dai controlli con accuratezza=76.5% e i pazienti SMSP rispetto a quelli con SMRR con accuratezza=61%. Usando la connettività dinamica, l'accuratezza di classificazione per il peggioramento clinico a 5 anni era =0,71, e per la conversione a SMSP era =0,63.

Nell'Esperimento 3, network strutturali e funzionali di un terzo gruppo di 116 pazienti con SM e 65 controlli sono stati usati per identificare predittori delle performance cognitive.

Una peggiore performance nella memoria di lavoro era predetta da una ridotta anisotropia frazionaria (AF) nel corpo calloso e una ridotta connettività nel network fronto-parietale; una performance migliore era invece predet-

ta da una più bassa connettività nel network esecutivo e una più alta connettività nei network default mode e salience. Una peggiore performance attentiva era predetta da una ridotta AF nel corpo calloso e una ridotta connettività nei network default mode e fronto-parietale, mentre una migliore performance attentiva era predetta da una più alta connettività nei network esecutivo e fronto-parietale.

Infine, peggiori performance di inibizione erano predette da una ridotta AF nel corpo calloso e peduncolo cerebellare superiore, e da una connettività più bassa nel network fronto-parietale, mentre migliori performance di inibizione erano predette da una più alta connettività nel network esecutivo.

## CONCLUSIONI

La SM ha un'evoluzione estremamente eterogenea, poiché meccanismi differenti giocano un ruolo nello sviluppo della disabilità. Grazie ad analisi di network e classificazione, questo progetto ha migliorato la nostra comprensione della compromessa comunicazione fra regioni cerebrali, e di come essa porti all'accumulo di disabilità. Il progetto ha inoltre aiutato a identificare biomarker RM avanzati capaci di predire un'evoluzione clinica sfavorevole.

# The role of brain network connectivity and machine learning for predicting disease worsening and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is characterized by a great inter-individual variability of symptoms and disease course. Conventional MRI (cMRI) is extremely important for MS diagnosis and treatment decisions. However, cMRI predictive value on subsequent disease course is relatively low. This is likely due to the dependence of MS clinical disability from impaired communication among brain regions, rather than from focal damage to selected regions.

Functional and structural network MRI analysis is likely to improve our understanding of impaired communication mechanisms and provide clinically relevant information. Machine learning is able of learning to solve a task from labeled examples, without a specific human encoding of prior knowledge.

Against this background, aim of this project was to apply functional and structural network analysis to MRI datasets of patients with MS, and test the ability of the combined use of network metrics and machine learning

to study baseline functional/structural network reorganization, its impact on clinical/cognitive deficits and predict medium-term disease worsening.

## RESULTS

To fulfill the aims of this research project, we performed three experiments.

In Experiment 1, we derived functional and structural networks from baseline resting state functional MRI and high-resolution T1-weighted scans of 233 MS patients and 77 healthy controls (HC), and tested the ability of network damage to predict 6.4-year clinical worsening (CW). At follow-up, 105 (45%) patients had CW; 26/157 (16%) relapsing-remitting (RR) MS patients evolved to secondary progressive (SP) MS. Random forest analysis identified baseline disability, whole-grey matter/brain volumes, lower functional connectivity between default-mode networks, higher functional connectivity in the sensorimotor network and grey matter atrophy in the fronto-parietal

network as predictors of CW (accuracy=0.74). Baseline disability, whole-grey matter volume and grey matter atrophy in the sensorimotor network predicted SPMS conversion (accuracy=0.84). At ROC analysis, the inclusion of network MRI variables improved prediction of disability worsening and SPMS conversion.

In Experiment 2, we derived functional and structural networks from baseline resting state functional MRI and diffusion-weighted MRI of a second, independent cohort of 113 MS and 46 HC. Hence, we exploited mathematical properties and a proper encoding of networks in combination with support vector machine (SVM) to classify MS according to phenotype and predict 5.2-year CW. At follow-up, 54 (48%) patients had CW; 14/62 (22%) RRMS evolved to SPMS. At baseline, SVM on functional networks classified RRMS from HC with average accuracy=72.5%, progressive (P) MS from HC with average accuracy=85.2%, and PMS from RRMS patients with average accuracy=76%. A similar investigation using dynamic functional connectivity obtained a balanced accuracy>0.75 for HC vs PMS classification and ≈0.63 for RRMS vs PMS. A variation of the SVM-based approach applied to structural networks lead to average classification accuracies=62% for RRMS vs HC, 76.5% for PMS vs HC and 61% for PMS vs RRMS. A preliminary investigation performed on dynamic functional connectivity data showed balanced accuracies=0.71 for 5-year worsening prediction and ≈0.63 for SPMS conversion.

In Experiment 3, baseline diffusion-weighted MRI and resting state functional MRI from a third cohort of 116

MS and 65 HC were used to find network predictors of cognitive performances. A worse working memory/updating performance was predicted by lower corpus callosum fractional anisotropy (FA) and lower functional connectivity in the fronto-parietal network; conversely, a better performance was predicted by lower functional connectivity in the executive control network and higher connectivity in the default-mode and salience networks. A worse performance in the attention domain was predicted by lower corpus callosum FA and lower functional connectivity in fronto-parietal and default-mode networks; conversely, a better attention performance was predicted by higher functional connectivity in the executive control and fronto-parietal networks. Finally, worse inhibition performances were predicted by lower corpus callosum/superior cerebellar peduncle FA, as well as by lower functional connectivity in the fronto-parietal network, while better inhibition performances were predicted by higher functional connectivity in the executive control network.

## CONCLUSIONS

MS is characterized by a highly heterogeneous disease evolution, since a variety of different mechanisms play a role for the development of irreversible disability. Thanks to the use of advanced network analysis and classification techniques, this project improved our understanding of impaired communication mechanisms leading to the accumulation of irreversible disability, and helped to identify advanced MRI biomarkers able to predict an unfavorable clinical evolution and possible targets for new treatments.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Articles

- Conti L, Riccitelli GC, Preziosa P, Vizzino C, Marchesi O, Rocca MA, Filippi M. Effect of cognitive reserve on structural and functional MRI measures in healthy subjects: a multiparametric assessment. *J Neurol*. 2021 May;268(5):1780-1791. doi: 10.1007/s00415-020-10331-6
- Hidalgo de la Cruz M, Valsasina P, Sangalli F, Esposito F, Rocca MA, Filippi M. Dynamic functional connectivity in the main clinical phenotypes of multiple sclerosis *Brain Connect*. 2021 Oct;11(8):678-690. doi: 10.1089/brain.2020.0920
- Rocca MA, Valsasina P, Meani A, Pagani E, Cordani C, Cervellin C, Filippi M. Network damage predicts clinical worsening in multiple sclerosis: a 6.4-year study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021 May 21;8(4):e1006
- Marchesi O, Bonacchi R, Valsasina P, Preziosa P, Pagani E, Cacciaguerra L, Meani A, Conti L, Mistri D, Rocca MA, Filippi M. Functional and structural MRI correlates of executive functions in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2021 Aug 13;13524585211033184. doi: 10.1177/13524585211033184. Online ahead of print.

### Abstracts

- Tessadori J, Yamin MA, Valsasina P, Filippi M, Rocca MA, Sona D. Dynamic functional connectivity for the classification of multiple sclerosis phenotype: a hidden Markov model approach. 2021 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2021), April 13-16, 2021
- Cordani C, Valsasina P, Meani A, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Interhemispheric substrates of manual dexterity in patients with multiple sclerosis: a structural and functional MRI study. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2536 (poster presentation at the AAN 2021 Virtual Annual Meeting, April 17-22)
- Marchesi O, Valsasina P, Conti L, Mistri D, Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Resting state functional connectivity correlates of executive function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2540 (poster presentation at the AAN 2021 Virtual Annual Meeting, April 17-22)
- Rocca MA, Valsasina P, Marchesi O, Preziosa P, Sona D, Tessadori J, Yamin MA, Filippi M. The role of brain network functional connectivity and machine learning for the classification and characterization of disease phenotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2672 (poster presentation at the AAN 2021 Virtual Annual Meeting, April 17-22)
- Valsasina P, Hidalgo de la Cruz M, Meani A, Gobbi C, Gallo A, Zecca C, Bisecco A, Rocca MA, Filippi M. Damage of different CNS compartments contributes to explain multiple sclerosis disability milestones: a multi-center study. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2678 (poster presentation at the AAN 2021 Virtual Annual Meeting, April 17-22)
- Rocca MA, Valsasina P, Marchesi O, Preziosa P, Sona D, Tessadori J, Yamin MA, Filippi M. Classifying and characterizing multiple sclerosis disease phenotypes with functional connectivity and machine learning. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 140 (oral presentation at the EAN 2021 Congress, 19-22 June 2021)
- Cordani C, Valsasina P, Meani A, Pagani E, Morozumi T, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Interhemispheric substrates of manual dexterity in multiple sclerosis patients: a structural and functional MRI study. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 311 (e-poster presentation at the EAN 2021 Congress, 19-22 June 2021)
- Cordani C, Valsasina P, Meani A, Pagani E, Morozumi T, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Interhemispheric predictors of disability and upper limb motor impairment in patients with multiple sclerosis: A structural and functional MRI study. *J Neurol Sci* 2021; 429: 14 (117667) doi:10.1016/j.jns.2021.117667. (WCN/SIN Congress 2021)
- Rocca MA, Valsasina P, Marchesi O, Preziosa P, Sona D, Tessadori J, Abubakar Yamin M, Filippi M. The role of brain network functional connectivity and machine learning for the classification and characterization of disease phenotypes in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2021; 429: 63 (117770).doi:10.1016/j.jns.2021.117770 (WCN/SIN Congress 2021)
- Valsasina P, Marchesi O, Preziosa P, Sona D, Tessadori J, Yamin MA, Filippi M, Rocca MA. The role of brain network functional connectivity and machine learning for the classification and characterization of disease phenotypes in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 468-469 (ECTRIMS 2021)
- Cordani C, Preziosa P, Valsasina P, Meani A, Morozumi T, Rocca MA, Filippi M. Interhemispheric substrates of clinical disability and upper limb motor function in multiple sclerosis patients: a structural and functional MRI study. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 725-726 (ECTRIMS 2021)
- Valsasina P, Hidalgo de la Cruz M, Meani A, Gobbi C, Gallo A, Zecca C, Bisecco A, Rocca MA, Filippi M. Damage of different CNS compartments contributes to explain multiple sclerosis disability milestones: a multicenter study. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2021; 29: 489 (ISMRM 2021)

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 250.000 €**  
Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years and the amount of € 250,000

# Valutazione dell'atrofia della sostanza bianca nella sclerosi multipla: assottigliamento dei fasci di fibre e perdita assonale



## Maria A. Rocca

Unità di Neuroimaging Quantitativo della Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Massimo Filippi, Loredana Storelli, Elisabetta Pagani, Ermelinda De Meo, Gianna Riccitelli**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Numerosi studi hanno dimostrato come il danno della sostanza grigia (SG) dell'encefalo, in termini di perdita di volume (una misura di neurodegenerazione), abbia un ruolo maggiore rispetto al danno della sostanza bianca (SB) nello spiegare la presenza di disabilità clinica nei pazienti con sclerosi multipla (SM). Tuttavia, è riconosciuto che il danno dei fasci della SB può condurre a una disconnessione tra diverse strutture di SG, causando dei disturbi cognitivi. I risultati precedenti potrebbero essere inficiati dal fatto che, ad oggi, mancano delle tecniche specifiche in grado di misurare in vivo i fenomeni neurodegenerativi a livello della SB. Negli ultimi anni, sono stati proposti alcuni modelli avanzati basati sulla risonanza magnetica (RM) pesata in diffusione, in grado di risolvere la complessa struttura della SB e di rilevare diversi aspetti di neurodegenerazione a tale livello, tra cui la perdita assonale e il restringimento della sezione trasversa dei fasci di fibre. Sebbene queste misure siano già state validate in diverse condizioni (dati simulati, campioni post-mortem e acquisizioni in vivo) il loro utilizzo per caratterizzare l'atrofia della SB rimane da esplorare su numerosità consistenti di pazienti affetti da SM e in studi longitudinali.

L'obiettivo principale di questo progetto è dunque quello di studiare l'atrofia della SB in pazienti con SM utilizzando tecniche avanzate di RM pesata in diffusione per produrre valori più specifici di volume assonale e cambiamenti del diametro dei fasci di fibre. Verificare, inoltre, se attraverso l'uso di queste misure si possa spiegare meglio la progressione di disabilità clinica e cognitiva rispetto all'uso delle consuete stime di atrofia della SB.

Per lo scopo di questo progetto, sono stati arruolati 86

pazienti con diagnosi di SM (43 con forma recidivante-remittente [RR] e 43 progressiva [P]) e 55 volontari sani. Tutti i soggetti hanno effettuato una RM e una valutazione clinica e cognitiva mediante la scala clinica Expanded Disability Status Scale (EDSS) e il Symbol Digit Modalities Test (SDMT), sia alla visita basale che (per un sottogruppo di 60 SM e 30 controlli) di follow-up a distanza di un anno.

## RISULTATI

Dall'analisi delle immagini RM sono state ottenute le seguenti misure: (1) indici di atrofia dell'encefalo, SG e SB; (2) stima del tensore di diffusione da cui sono state derivate le mappe di diffusività media e anisotropia frazionaria; (3) stima delle misure di volume intra-cellulare (vic) dal modello multi-compartimentale Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging (NODDI), e la stima della sezione trasversa dei fasci di fibre (FC) dal modello di deconvoluzione sferica ristretta. Le misure (2) e (3) sono state estratte per la SB sia a livello globale che voxel-based, per la visita basale e di follow-up.

Globalmente, tutte le misure di RM hanno rilevato alterazioni significative al basale nei pazienti con SM rispetto ai controlli ( $p < 0.001$ ). Tali alterazioni erano presenti anche nel solo fenotipo a RR di malattia rispetto ai soggetti sani. Per quanto riguarda le misure avanzate di RM pesata in diffusione, le misure di FC e vic si sono rivelate essere i migliori predittori rispettivamente dei punteggi di EDSS e SDMT al basale, con una migliore associazione con le misure cliniche, rispetto alle altre misure di RM analizzate. Dall'analisi voxel-based, la misura della sezione trasversale dei fasci di fibre ha rilevato con maggior dettaglio anatomico l'atrofia di specifici tratti di SB per tutti i con-

fronti valutati (pazienti con SM verso controlli, pazienti con SMRR verso controlli, pazienti con SMP verso SMRR), rispetto alle altre misure derivate dalla RM pesata in diffusione (legate più alle alterazioni dovute alle lesioni nella SB). Questi risultati sono stati confermati dall'analisi longitudinale, dove la misura di FC ha mostrato un'ulteriore degenerazione dei tratti di SB già alterati al basale nei pazienti con SM (splenio del corpo calloso, commissura anteriore, e cingolo bilaterale per le forme progressive), mentre le altre misure di RM indagate (mappe derivate dal tensore di diffusione e vic) non hanno rilevato alterazioni significative nei pazienti.

## CONCLUSIONI

In questo progetto, misure più specifiche di neurodegenerazione della SB hanno mostrato la loro capacità nello spiegare meglio la disabilità clinica e cognitiva nei pazienti con SM, rispetto ad una stima volumetrica globale della SB. Essendo la SM una malattia eterogenea, con diversi substrati patologici, l'uso combinato di misure di atrofia derivate da specifici indici di diffusione (FC e vic) può fornire una comprensione migliore dei processi neurodegenerativi a livello della SB e della loro evoluzione temporale, in termini di perdita assonale e/o atrofia dei fasci di fibre. Alla luce dei risultati ottenuti, l'uso di queste misure è da incoraggiare per futuri studi che vogliano investigare meglio i cambiamenti della sostanza bianca che avvengono nei pazienti con SM.

# Assessment of white matter atrophy in multiple sclerosis: fibre bundle shrinkage and microstructural axonal loss

## INTRODUCTION AND AIMS

In multiple sclerosis (MS), substantial evidence has emerged that the gray matter (GM) is heavily affected by neurodegenerative phenomena and that GM atrophy is more relevant than white matter (WM) atrophy in explaining clinical disability and disease progression. On the other hand, there is a primary damage to the WM that precedes, at least in part, GM loss and that may cause a structural disconnection between different GM structures. Such a disconnection has been recognized as one of the most important factors associated with the presence of cognitive impairment. Defining, in vivo, the processes going on at WM level in MS could be relevant to improve our understanding of some of the disease clinical manifestations. The currently used methods of analysis of WM damage are limited by their inability of accounting for the complexity of WM structure. Recently, a number of advanced MRI models, based on diffusion imaging (DWI), have been proposed that can resolve the complex WM microstructure, including the constrained spherical deconvolution (CSD) and the Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging (NODDI) model. From the first model, a measure of fibre bundle cross-sectional (FC) area can be derived that is a relative measure of the fibre bundle shrinkage or enlargement aligned with fibre perpendicular direction. The NODDI model is a multi-compartment diffusion model that maps the intra-cellular volume fraction (vic), that is considered a measure of axonal volume. Although these techniques have been already validated on simulated, post-mortem and in vivo data, their use for

WM atrophy characterization in MS needs to be further explored in vivo in a significant number of patients and in a longitudinal framework.

The main aim of this project is to study WM atrophy in MS patients with DWI-derived measures that take into account the complexity of WM architecture. For this project, we obtained clinical (Expanded Disability Status Scale [EDSS]), neuropsychological (Symbol Digit Modalities Test [SDMT]) and MRI assessments at baseline from 86 MS patients (43 relapsing-remitting [RR] and 43 progressive [P] MS) and 55 healthy controls (HCs). Follow-up examinations have been obtained from 60 MS patients and 30 HCs.

## RESULTS

MRI pre-processing included: (1) the measurement of lesion volumes and indices of atrophy for the whole brain, the GM and the WM; (2) estimation of the diffusion tensor model and derived maps of mean diffusivity (MD) and fractional anisotropy (FA) from DWI; (3) estimation of the NODDI intra-cellular volume fraction (vic) and the fiber bundle cross-section (FC) atrophy maps from the CSD model. Measures from DT, NODDI and CSD were derived within the WM from baseline and follow-up MRI scans both globally, as well as voxel- (or fixel-) based. The following comparisons were performed for all the measures: MS patients vs HC, RRMS patients vs HC, RRMS vs PMS patients.

All global measures detected significant tissue alterations in MS patients, including the relapsing-remitting forms of



the disease, in comparison to HC ( $p < 0.001$ ). These significant differences were also detectable in the comparisons among the different groups (HC vs RRMS, RRMS vs PMS), except for GMV and normalized brain volume.

We found FC and vic measures to be the best predictors of EDSS and SDMT scores, respectively, suggesting the benefit of using the proposed advanced DW-measures to better explain clinical outcomes in patients with MS. From the voxel-based analyses, we found a significant FC atrophy of specific tracts for all the comparisons; while FA, MD and vic showed significant alterations in WM regions that were mainly associated with WM lesions ( $p < 0.05$ ).

At follow-up, only FC measures showed a further degeneration of WM tracts already altered at baseline (splenium of the corpus callosum, anterior commissure and cingulum for PMS, bilaterally). The other measures (FA, MD and vic) showed no further regions of WM alterations in respect to the baseline. Voxel-based analyses highlighted the abil-

ity of the FC measure to detect WM atrophy with greater anatomical specificity and better capability to distinguish MS clinical phenotypes, even at 1-year of follow-up.

## CONCLUSIONS

The measures proposed demonstrated to be sensitive to different neurodegenerative aspects: one being more specific towards intra-axonal volume, while the other includes modifications also related to inflammation and gliosis. The combined study of the variations of these two measures and their relationship with other measures of structural damage could improve the understanding of the factors that imply progression or regression of disability in MS. This study demonstrates that two advanced DW-derived measures of WM atrophy, when used in combination, better capture WM degeneration and its clinical relevance, thus offering the chance to obtain new insights into white matter changes occurring in MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Storelli L, Pagani E, Meani A, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. *Advanced diffusion-weighted imaging models better characterize white matter neurodegeneration and clinical outcomes in multiple sclerosis*. Submitted to *European Journal of Neurology*
- Storelli L, Pagani E, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. *Measurement of white matter fiber-bundle cross-section in multiple sclerosis using diffusion-weighted imaging*. *Mult Scler J* 2021;27(6):818-826. doi: 10.1177/1352458520938999
- Storelli L, Pagani E, Esposito F, Cacciaguerra L, De Meo E, Filippi M, Rocca MA. *Measurement of White Matter Atrophy in Multiple Sclerosis using Diffusion Weighted Imaging*. Eposter at 5th EAN Congress di Oslo, 29 June-2 July 2019
- Storelli L, Pagani E, Esposito F, Cacciaguerra L, De Meo E, Filippi M, Rocca MA. *Measurement of white matter atrophy in multiple sclerosis using diffusion weighted imaging*. *Mult Scler J* 2019; 25 (S2):238
- Storelli L, Pagani E, Esposito F, Cacciaguerra L, De Meo E, Filippi M, Rocca MA. *Measurements of white matter atrophy in multiple sclerosis using diffusion weighted imaging*. *Neurol Sci* 2019; 40 (Suppl October 2019): S45-S46
- Bonacchi R, Meani A, Bassi C, Pagani E, Filippi M, Rocca MA. *MRI-based clustering of multiple sclerosis patients in the perspective of personalized medicine (3930)*. *Neurology* 2020; 94 (15 Supplement): P1.1-013.
- Storelli L, Pagani E, Preziosa P, Esposito F, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. *Measurement of white matter atrophy in multiple sclerosis using diffusion weighted imaging (1476)*. *Neurology* 2020; 94 (15 Supplement): P1.1-020
- Pagani E, Storelli L, Preziosa P, Esposito F, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. *Measurement of white matter atrophy in multiple sclerosis using diffusion weighted imaging*. Accepted as Digital Poster at the 2020 ISMRM Scientific Meeting, Sydney, 8-14 August 2020
- Bonacchi R, Meani A, Bassi C, Pagani E, Filippi M, Rocca MA. *MRI-based clustering of multiple sclerosis patients in the perspective of personalized medicine*. *Eur J Neurol* 2020; 27 (suppl 1): 44 oral presentation at the EAN 2020 Congress - Paris, 23-26 May 2020
- Bonacchi R, Mistri D, Meani A, Zanghì A, Filippi M, Rocca MA. *Cardiovascular risk factors affect brain volume in young MS patients*. *MS Virtual 2020 - 8th Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting*, September 11-13, 2020; PS04.05
- Bonacchi R, Rocca MA, Meani A, Pagani E, Filippi M. *MRI-based clustering of MS patients in the perspective of personalized medicine*. *MS Virtual 2020 - 8th Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting*, September 11-13, 2020; P0608
- Bonacchi R, Rocca MA, Meani A, Pagani E, Filippi M. *MRI-based clustering of multiple sclerosis patients in the perspective of personalized medicine*. *Neurol Sci* 2020; 41 (Suppl 1): S240-S241
- Bonacchi R, Mistri D, Meani A, Zanghì A, Filippi M, Rocca MA. *Cardiovascular risk factors affect brain volume in young MS patients*. *Neurol Sci* 2020; 41 (Suppl 1): S294-S295

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 100.000 €**  
Research Project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years and the amount of € 100,000



# Il ruolo del NODDI per migliorare la definizione delle alterazioni microstrutturali della sostanza grigia nella sclerosi multipla: relazione con la disabilità clinica e la compromissione cognitiva



## Paolo Preziosa

Unità di Neuroimaging Quantitativo della Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale,  
Divisione di Neuroscienze, Fondazione Centro San Raffaele, Milano, Italia

MENTORE/MENTOR  
**Maria A. Rocca**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Studi di patologia e di risonanza magnetica (RM) hanno dimostrato che il danno della sostanza grigia (SG) è diffuso nella sclerosi multipla (SM) e rappresenta uno dei migliori predittori di disabilità clinica e deterioramento cognitivo. Data la rilevanza clinica del danno della SG, l'identificazione di misure di RM più specifiche per i diversi substrati fisiopatologici che colpiscono la SG nella SM, come il danno neuronale, assonale e dendritico, potrebbe migliorare la comprensione dei meccanismi patologici della SM e delle loro relazioni con le manifestazioni cliniche della malattia, fornendo così misure RM accurate per monitorarne l'evoluzione. Grazie a una migliore valutazione della complessità della microarchitettura cerebrale, il NODDI (Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging) è un nuovo modello avanzato di analisi della RM pesata in diffusione (DW) che può quantificare più specificatamente in vivo le alterazioni della microarchitettura della SG, che rispecchiano meglio i fenomeni neurodegenerativi descritti negli studi patologici alla base delle manifestazioni cliniche della SM. L'obiettivo principale di questo progetto è stato quello di applicare il modello NODDI a sequenze di RM pesate in diffusione in due coorti di pazienti con SM e controlli sani per studiare meglio il danno microstrutturale della SG nella SM, che riflette i fenomeni neurodegenerativi della malattia, e la sua relazione con il fenotipo clinico della malattia, la disabilità clinica e i deficit cognitivi.

### RISULTATI

In questo studio, abbiamo implementato una sequenza di RM pesata in diffusione in due coorti di pazienti con SM (n=172) e controlli (n=62) per quantificare le misure

NODDI ottimizzate per la SG e la sostanza bianca (SB). In particolare, abbiamo studiato l'intracellular volume fraction (ICV<sub>f</sub>), considerata una misura del volume di assoni e dendriti, e l'orientation dispersion index (ODI), che riflette la variabilità dell'orientamento dei neuriti. Abbiamo studiato l'ICV<sub>f</sub> e l'ODI nella corteccia senza lesioni e nelle lesioni corticali di 172 pazienti con SM (101 recidivante-remittente [RR], 71 progressiva [P]) e 62 controlli sottoposti a una RM dell'encefalo a 3T.

La corteccia senza lesioni dei pazienti con SM aveva un ICV<sub>f</sub> inferiore rispetto alla corteccia dei controlli. Le lesioni corticali hanno mostrato un ICV<sub>f</sub> e ODI più bassi rispetto alla corteccia senza lesioni sia dei pazienti con SM che dei CS. Rispetto ai pazienti con SM a ricadute e remissioni (SMRR), quelli con SM progressiva (SMP) presentavano ICV<sub>f</sub> e ODI della corteccia senza lesioni significativamente più bassi. Le misure del NODDI delle lesioni corticali non erano significativamente diverse tra le forme di malattia. Infine, i valori ICV<sub>f</sub> e ODI della corteccia senza lesioni dei pazienti con SM erano significativamente correlati con la durata della malattia, la disabilità clinica, il volume delle lesioni della SB e l'atrofia cerebrale.

Utilizzando NODDI, abbiamo quantificato l'ICV<sub>f</sub> e l'ODI nelle lesioni corticali e della SB, nel talamo, e nella corteccia e nella SB senza lesioni di 152 pazienti con SM e 48 controlli sani sottoposti anche a valutazione neuropsicologica completa. Rispetto ai controlli, i pazienti con SM hanno mostrato un ICV<sub>f</sub> più basso nel talamo, e nella corteccia e nella SB senza lesioni ed un ODI inferiore nella corteccia senza lesioni. I pazienti con compromissione cognitiva hanno mostrato anche un aumento dell'ODI nella SB senza lesioni. Rispetto ai pazienti preservati, quelli con

deterioramento cognitivo presentavano un ICV\_f più basso nella corteccia e nella SB senza lesioni, un ODI ridotto nelle lesioni della SB e un ODI aumentato nella SB senza lesioni. Le misure del NODDI studiate nelle varie regioni cerebrali erano significativamente correlate con la gravità del deterioramento cognitivo.

## CONCLUSIONI

Il nostro studio mostra che vi è una significativa perdita di neuriti nella corteccia dei pazienti con SM che è clinicamente rilevante. Le lesioni corticali mostrano un'ulteriore riduzione della densità dei neuriti e una semplificazione della complessità dei neuriti. Il danno neuro-assonale e la perdita della fisiologica microarchitettura della corteccia, del talamo e della SB senza lesioni sono associati al dete-

rioramento cognitivo nella SM.

Applicando NODDI in un'ampia coorte di pazienti con SM, il progetto ha contribuito a caratterizzare il danno microstrutturale correlato alla SM (perdita assonale e dendritica, diminuzione della coerenza tissutale) nelle diverse fasi della malattia e la sua relazione con disabilità clinica e deterioramento cognitivo. Il nostro studio ha dimostrato che NODDI può essere un modello utile per indagare in vivo i complessi processi patologici che colpiscono il cervello nella SM e che sono clinicamente rilevanti. Il nostro studio ha contribuito anche a identificare possibili misure di RM accurate in grado di rilevare e monitorare in vivo i diversi meccanismi di neurodegenerazione nella GM che potrebbero rappresentare un nuovo marcatore per monitorare il decorso della malattia.

# The role of NODDI to disentangle gray matter neuroanatomical microstructural abnormalities in multiple sclerosis: relation with clinical disability and cognitive impairment

## INTRODUCTION AND AIMS

Pathology has shown that gray matter (GM) abnormalities are extensive in multiple sclerosis (MS) and recent magnetic resonance imaging (MRI) studies have consistently demonstrated that GM damage represents one of the best predictors of clinical disability and cognitive impairment in MS. Due to clinical relevance of GM damage, the identification of MRI measures more specific to the different pathophysiological substrates affecting the GM of MS patients, such as neuronal, axonal and dendritic damage, could improve our understanding of the pathological mechanisms of MS and their relationships with disease clinical manifestations, thus providing reliable MRI measures to monitor disease progression. Thanks to a better evaluation of brain microarchitecture complexity, Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging (NODDI) model is a novel advanced MRI model based on diffusion-weighted (DW) imaging that has been suggested to provide in vivo quantitative measures of GM microarchitecture abnormalities, that better reflect the neurodegenerative phenomena described in pathological studies and that strongly contribute to MS clinical manifestations. The main aim of this project was to apply the NODDI model to DW MRI in two large cohorts of MS patients and healthy controls (HC) to better investigate GM microstructural damage in MS, reflecting the neurodegenerative phenomena (neuro-axonal damage) of the disease, and their relation with disease clinical phenotype, locomotor disability and cognitive impairment.

## RESULTS

For this study, we implemented a DW sequence in two cohorts of MS patients (n=172) and healthy controls (HC) (n=62) to estimate maps of NODDI measures with optimized parameters for the GM and the white matter (WM). In particular, we investigated intra-cellular volume fraction (ICV\_f), which is considered a measure of neurite (axonal and dendrite) volume and orientation dispersion index (ODI), which reflects neurite orientation variability. We investigated ICV\_f and ODI in normal-appearing cortex (i.e., the cortex without focal lesions) and in cortical lesions from 172 MS patients (101 relapsing-remitting [RR], 71 progressive [P]) and 62 HC who underwent a brain 3T MRI. We found that normal-appearing cortex of MS patients had significantly lower ICV\_f compared to HCs' cortex. Cortical lesions showed significantly lower ICV\_f and ODI compared to normal-appearing cortex of both HCs and MS patients. Moreover, compared to patients with RRMS, those with PMS had significantly lower normal-appearing cortex ICV\_f and ODI. Cortical lesions showed no microstructural differences between MS clinical phenotypes. Finally, ICV\_f and ODI values of normal-appearing cortex of MS patients were significantly correlated with disease duration, clinical disability, the volume of WM lesions and global and regional brain atrophy. Then, we evaluated 152 MS patients and 48 HC who underwent a brain 3T MRI and a comprehensive neuropsychological evaluation. Using NODDI, ICV\_f and ODI

were assessed in cortical and WM lesions, thalamus, normal-appearing cortex and normal-appearing WM. Compared to HC, both cognitively impaired and preserved MS patients showed significantly lower normal-appearing cortex, thalamic and normal-appearing WM ICV\_f and normal-appearing cortex ODI. Cognitively impaired MS patients showed also a significantly increased normal-appearing WM ODI. Compared to cognitively preserved MS patients, those with cognitive impairment had significantly decreased normal-appearing cortex and WM ICV\_f, decreased WM lesion ODI and increased normal-appearing WM ODI. Normal-appearing cortex ICV\_f and normal-appearing WM ICV\_f and ODI were significantly correlated with the severity of cognitive impairment.

## CONCLUSIONS

Our project showed that a significant neurite loss occurs in MS normal-appearing cortex that is clinically relevant. Cortical lesions show a further neurite density reduction

and a simplification of neurite complexity. Regarding cognitive impairment, normal-appearing cortex, thalamic and normal-appearing WM neuro-axonal loss, together with normal-appearing WM loss of tissue coherence, are associated with cognitive impairment in MS.

By applying NODDI in a large cohort of MS patients, the project contributed to characterize MS-related microstructural damage (axonal and dendritic loss, decreased tissue coherence) in the different phases of the disease and its relation with clinical disability and cognitive impairment. In particular, our study showed that NODDI may be a rewarding and relevant model to investigate and disentangle in-vivo the heterogeneous pathological processes affecting the brain in MS that are clinically relevant. Our study contributes also to identify reliable in-vivo MRI measures capable to detect and monitor different mechanisms of GM neurodegeneration that could represent novel outcome measure for monitoring the disease course.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Publications

- Preziosa P, Pagani E, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Falini A, Rocca MA, Filippi M. In vivo detection of damage in multiple sclerosis cortex and cortical lesions using NODDI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021 (in press). Epub ahead of print 20 November 2021; doi: 10.1136/jnnp-2021-327803

### Congress Presentations

- Preziosa P, Pagani E, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. Relevance of NODDI to characterise in vivo the microstructural abnormalities of multiple sclerosis cortex and cortical lesions: a 3T study. *Mult Scler J* 2020; 26 (S3): 422. 8th Joint ACTRIMS/ECTRIMS Meeting - MSVirtual2020, September 11th-13th 2020
- Preziosa P, Pagani E, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. Relevance of NODDI to characterise in vivo the microstructural abnormalities of multiple sclerosis cortex and cortical lesions: a 3T study. *Neurol Sci* 2020; 41 (Suppl 1): S246-S247. 51° Congresso Nazionale Società Italiana di Neurologia (SIN), Virtual Meeting, November 28th-30th 2020
- Preziosa P, Pagani E, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. Relevance of NODDI to characterise in vivo the microstructural abnormalities of multiple sclerosis cortex and cortical lesions: a 3T study. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2560. 73rd AAN Virtual Annual Meeting, April 17th-22nd 2021
- Preziosa P, Conti L, Rocca MA, Marchesi O, Pagani E, Filippi M. NODDI microstructural abnormalities in normal-appearing gray and white matter contribute to cognitive impairment in MS. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 97. 7th Congress of the EAN - Virtual, June 19th-22nd 2021
- Preziosa P, Pagani E, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Relevance of NODDI to characterize microstructural abnormalities of MS cortex and cortical lesions in vivo: a 3T study. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 138. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 97. 7th Congress of the EAN - Virtual, June 19th-22nd 2021
- Preziosa P, Conti L, Pagani E, Marchesi O, Rocca MA, Filippi M. NODDI microstructural abnormalities in normal-appearing gray matter and white matter contribute to cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2021; 429: 8 (118088). doi:10.1016/j.jns.2021.118088. 25th World Congress of Neurology - Virtual, October 3rd-7th 2021
- Preziosa P, Conti L, Pagani E, Marchesi O, Falini A, Rocca MA, Filippi M. NODDI microstructural abnormalities in normal-appearing gray matter and white matter contribute to cognitive impairment in multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 176-177. 37th ECTRIMS meeting, virtual, October 13th-15th 2021
- Pagani E, Preziosa P, Bonacchi R, Cacciaguerra L, Filippi M, Rocca MA. Relevance of NODDI to characterise in vivo the microstructural abnormalities of multiple sclerosis cortex and cortical lesions: a 3T study. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2021; 29: 3426. 2021 ISMRM & SMRT Annual Meeting & Exhibition, May 15th-20th May 2021

### **Borsa di Studio Senior finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 3 anni (terminata anticipatamente) e l'ammontare di 102.000€**

Senior Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 3 years (early terminated) and the amount of € 102,000

# Predizione della progressione di malattia nei pazienti con sclerosi multipla tramite modelli di intelligenza artificiale applicati a immagini di risonanza magnetica



## Loredana Storelli

Unità di Neuroimaging Quantitativo, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

MENTORE/MENTOR  
**Massimo Filippi**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria, demielinizzante e neurodegenerativa che colpisce il sistema nervoso centrale, caratterizzata da diversi meccanismi patologici che svolgono un ruolo cruciale per la progressione di disabilità. La risonanza magnetica (RM) rappresenta uno strumento importante per la diagnosi e il monitoraggio in-vivo dei pazienti con SM. Tuttavia, il ruolo prognostico della RM nel predire l'evoluzione della malattia è ancora molto dibattuto. Negli ultimi anni, alcuni algoritmi di intelligenza artificiale (deep-learning) hanno mostrato risultati eccellenti per applicazioni su immagini mediche, ed in particolare, sfruttando elevate quantità di dati attualmente disponibili, permettono di estrarne le caratteristiche di interesse.

L'obiettivo di questa borsa di studio è stato quello di implementare un algoritmo di deep-learning per definire un modello di progressione della malattia, in grado di predire il peggioramento clinico e/o cognitivo nei pazienti con SM partendo da immagini di RM. Questo progetto è stato svolto utilizzando un'elevata numerosità di pazienti con SM che presentavano un'acquisizione RM a una prima valutazione e un follow-up clinico ad almeno due anni dal basale, collezionati all'interno dell'Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI), supportata da FISM. Le misure di accuratezza, sensibilità, specificità nel prognosticare la progressione clinica e/o cognitiva sono state utilizzate per valutare il modello implementato e confrontare le sue prestazioni rispetto a quelle di due esperti neurologi.

### RISULTATI

Per questo studio abbiamo collezionato dalla piattaforma INNI i dati clinici e di RM al basale e dopo due anni

di 373 pazienti con diagnosi di SM. Tutti i pazienti sono stati valutati a entrambe le visite mediante la scala clinica EDSS (Expanded Disability Status Scale) e per 151 pazienti è stata fatta una valutazione cognitiva tramite il Symbol Digit Modalities Test (SDMT). Il peggioramento clinico è stato definito con un incremento di EDSS  $\geq 1.5$  con EDSS basale =0;  $\geq 1.0$  con EDSS basale  $< 6.0$ ; e  $\geq 0.5$  con EDSS basale  $\geq 6.0$ . Il peggioramento cognitivo è stato definito con un incremento del punteggio grezzo per l'SDMT di almeno 4 punti a due anni dal basale. I dati di 325 pazienti sono stati utilizzati per addestrare l'algoritmo di intelligenza artificiale, mentre i dati dei restanti pazienti (acquisiti su uno scanner di RM differente) sono stati usati per la validazione finale. Il modello implementato è basato su reti neurali convoluzionali che, a partire da immagini convenzionali di RM pesate in T2 e T1 e un vettore binario designante l'evoluzione della malattia a due anni (0=stabile, 1=peggiolata), è in grado di definire una prognosi clinica e cognitiva solo sulla base delle caratteristiche della RM al basale. Dalla validazione sui dati di addestramento abbiamo ottenuto un'accuratezza massima dell'80% nel predire il peggioramento clinico basato su EDSS; mentre combinando dati clinici e cognitivi, l'accuratezza del modello raggiunge l'87%. Sul set di dati del test, l'accuratezza nel predire l'evoluzione di disabilità dopo due anni è dell'83.3%, con sensibilità e specificità pari a 57.1% e 90%, rispettivamente. Nel caso della prognosi del peggioramento cognitivo, l'algoritmo raggiunge un'accuratezza pari a 67.7%, con sensibilità pari a 60% e specificità uguale a 81.1%. Anche in questo caso, combinando informazione clinica e cognitiva nella fase di addestramento, l'algoritmo ottiene la massima accuratezza (85.7%), sensibilità (75%) e specificità (87.5%).

I risultati dell'algoritmo sono stati confrontati con quelli di due esperti neurologi che, in cieco rispetto all'identità e alla storia clinica dei pazienti, hanno valutato le immagini di RM al basale (T1 e T2 pesate) e hanno classificato i pazienti aventi prognosi negativa o positiva in base ai seguenti criteri: (1) almeno 9 lesioni encefaliche iperintense in T2; (2) almeno una lesione infratentoriale iperintensa in T2; (3) almeno una lesione corticale/juxtacorticale ipointensa in T1; (4) atrofia cerebrale; (5) almeno 9 lesioni encefaliche ipointense in T1. La presenza di almeno 3 dei precedenti criteri è stata considerata indicativa di una prognosi clinica negativa. Sul test set, i valutatori esperti hanno ottenuto un'accuratezza pari a 70%, associata ad una sensibilità pari a 14.3% e una specificità uguale a 80%.

## CONCLUSIONI

Questo studio può rivelarsi di grande importanza per un'identificazione precoce dei pazienti con SM a rischio di un peggioramento clinico, al fine di ottimizzarne la gestione e migliorarne la qualità di vita. Il modello implementato si è rivelato accurato nel predire l'evoluzione clinica e cognitiva di malattia a due anni di follow-up a partire solamente da due sequenze convenzionali di RM dell'encefalo pesate in T2 e T1, superando le prestazioni di due esperti neurologi. Questo modello di intelligenza artificiale potrebbe essere un importante strumento per supportare, anziché sostituire, il neurologo clinico nella gestione del paziente con SM a rischio di peggioramento.

# A deep-learning approach to predict disease progression in multiple sclerosis using magnetic resonance imaging

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system, characterized by different pathological mechanisms that play a role for the progression of irreversible clinical disability. Magnetic resonance imaging (MRI) represents an important in-vivo tool for diagnosis and monitoring disease course and treatment in MS. However, the prognostic value of MRI for predicting disease evolution in patients with MS is still debated. Artificial intelligence and, in particular, deep-learning approaches have rapidly become popular models to be applied on MRI data, to make predictions or decisions without the need to identify a priori the critical features that will be used. In the field of MS, their application to predict disease progression remains largely unexplored. The aim of this fellowship project was to develop and apply a deep-learning algorithm on a large multicenter cohort of patients with MS collected from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to predict disease worsening from their baseline MRI features. Towards this goal, MS patients with a baseline MRI scan and a clinical and cognitive follow-up of at least two years were considered. The performance of the algorithm was then evaluated on an independent test-set and compared to that of two expert physicians.

## RESULTS

For the purpose of this one-year project, 373 MS patients (299 relapsing-remitting and 74 progressive forms) having a clinical follow-up of 2 years were collected from the INNI

repository. Both at baseline and at follow-up, all subjects underwent clinical assessment (rating of Expanded Disability Status Scale [EDSS]) and a subgroup of 151 MS patients had also a neuropsychological evaluation with the Symbol Digit Modalities Test (SDMT). We classified patients as clinically worsened when their EDSS score increase at follow-up was  $\geq 1.5$  when baseline EDSS was 0,  $\geq 1.0$  when EDSS at baseline was  $< 6.0$ , and  $\geq 0.5$  when EDSS at baseline was  $\geq 6.0$ . Cognitive worsening was defined when there was a SDMT raw score change of at least 4 points at follow-up. The whole dataset was separated into a training set (325 MS) and a test set (48 MS) which constituted an independent dataset for model evaluation.

We implemented a deep-learning architecture based on convolutional neural networks (CNN) for the prognosis of MS evolution using baseline conventional T2-weighted and T1-weighted images for each patient and a true class binary vector with the information on disease evolution (0=stable; 1=worsened) at two-years. The output of the algorithm was a probability value for each patient of belonging to one of the two classes: MS stable or MS worsening. From the validation on the training set, we obtained a maximum accuracy of 80% (mean absolute error  $< 0.01$ ) in predicting clinical worsening (based on EDSS score change at follow-up) that reached 87% when combining clinical and cognitive data.

On the independent test set, we found an accuracy of 83.3% for the prognosis of clinical disability worsening at follow-up. The sensitivity and specificity obtained by the algorithm for this prediction task were 57.1% and 90%, re-



spectively. For the prediction of cognitive worsening, the CNN model achieved an accuracy of 67.7%, with a sensitivity of 60% and a specificity of 81.8%. When combining clinical and cognitive information to train the model, the deep-learning algorithm reached 85.7% accuracy, 75% sensitivity and 87.5% specificity.

Two expert physicians, blinded to the identity and clinical history of each patient, performed the assessment of baseline T2-weighted and T1-weighted brain MRI scans and classified patients as having a negative or positive prognosis according to five MRI criteria: (1) at least nine T2-hyperintense brain lesions; (2) at least one T2-hyperintense infratentorial lesion; (3) at least one T1-hypointense cortical/juxtacortical lesion; (4) brain atrophy, evaluated qualitatively; (5) at least nine T1-hypointense brain lesions. The presence of at least 3 of these criteria was considered indicative of a negative clinical prognosis. Considering the test set only, expert raters showed an accuracy of 70% for

correct disease prognosis, with a sensitivity of 14.3% and a specificity of 80%.

## CONCLUSIONS

A prompt and appropriate treatment decision is of paramount importance to ameliorate management of MS patients, to positively influence disease course, improve patients' quality of life and to optimize MS-related costs. Within this fellowship, we obtained a robust and accurate model for predicting clinical and cognitive worsening of MS at two years, based on T1-weighted and T2-weighted brain MRI scans at baseline. This algorithm has the potential to be an important tool for supporting, rather than replacing, physicians in their clinical routine for the prompt management of MS patients at risk of disease worsening. In future, the capabilities of radiologists may be improved and broadened by these tools.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Storelli L, Azzimonti M, Gueye M, Preziosa P, Tedeschi G, De Stefano N, Pantano P, Filippi M, Rocca MA. A Deep-learning approach to predicting disease progression in multiple sclerosis using magnetic resonance imaging. Accepted for publication in *Investigative Radiology*
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratin P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: application to the multicenter INNI dataset. Accepted as Digital Poster at the 37th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Meeting, Virtual Meeting, 13-15 October 2021
- Storelli L, Pagani E, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Advanced diffusion-weighted imaging models better characterize white matter neurodegeneration and clinical outcomes in multiple sclerosis. Accepted as Digital Poster at the 37th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Meeting, Virtual Meeting, 13-15 October 2021

**Borsa di studio di Ricerca finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 26.000 €**

Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year and the amount of € 26,000

# Validazione dell'imaging funzionale come biomaker innovativo della progressione della patologia in un modello sperimentale di sclerosi multipla



## Pasquina Marzola

*Dipartimento di Informatica, Università di Verona, Verona, Italia*

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Alice Busato**, *Dipartimento di Informatica, Università di Verona*

**Pietro Bontempi**, *Dipartimento di Informatica, Università di Verona*

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHERS GROUPS

**Gabriela Constantin**, *Dipartimento di Medicina, Università di Verona*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Studi di Risonanza Magnetica funzionale hanno dimostrato plasticità cerebrale, cioè capacità del cervello di riorganizzarsi, nei pazienti con sclerosi multipla (SM). La plasticità cerebrale può migliorare notevolmente la qualità della vita dei pazienti dato che potrebbe permettere di eseguire uno specifico compito anche se l'area o le aree normalmente deputate al controllo di tale funzione risultano danneggiate. Pertanto terapie che promuovano la plasticità cerebrale nei pazienti con SM sono fortemente necessarie e l'effetto sulla plasticità cerebrale dovrebbe essere considerato quando si sperimentano nuove terapie. In questo contesto, lo scopo del progetto è stato quello di mettere a punto un protocollo sperimentale che permettesse di validare biomarcatori funzionali specifici del decorso della patologia Encefalomielite Sperimentale Autoimmune (ESA) tramite acquisizioni di risonanza magnetica funzionale a riposo, in vista della futura applicazione alla sperimentazione preclinica di nuove terapie.

## RISULTATI

Abbiamo messo a punto con successo un protocollo sperimentale non-invasivo di neuroimaging che potrà essere utilizzato nella sperimentazione di nuovi farmaci. Il protocollo comprende acquisizioni morfologiche, microstrutturali e funzionali, che possono essere eseguite longitudinalmente sullo stesso soggetto con vantaggi dal punto di vista etico. Questo progetto ha generato una grande quantità di dati che è al momento ancora in fase di analisi.

## CONCLUSIONI

Lo scenario attuale delle terapie per la SM è ancora largamente inadeguato e giustifica la ricerca di nuovi trattamenti. Il nostro progetto ha messo a punto un protocollo di acquisizione di neuroimaging che potrebbe essere inserito nella sperimentazione preclinica di nuovi farmaci\terapie permettendo di valutarne l'efficacia terapeutica sulla riorganizzazione funzionale. I risultati del nostro progetto aprono la strada all'applicazione delle tecniche funzionali per la ricerca di nuovi approcci terapeutici.



# Validation of rsfMRI as innovative biomarker for disease progression in an experimental model of multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Functional MRI studies performed in patients with multiple sclerosis (MS) have demonstrated brain plasticity, i.e. the brain's ability to reorganize itself. Plasticity can greatly improve patients' lives as it may allow them to perform a specific task even if the area or areas that in normal conditions control that function are damaged. Therefore, therapies that promote plasticity in MS patients are strongly needed and the effect on brain plasticity should be considered as new therapies are experimented. In this context, the aim of this project was to develop an experimental protocol that would allow to validate specific functional biomarkers of the evolution of the pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Such biomarkers are obtained by non-invasive functional magnetic resonance acquisitions in the resting state, in view of future application to the preclinical phase of validation of new therapies.

## RESULTS

We have successfully developed a non-invasive experimental neuroimaging protocol that can be used in the pre-clinical efficacy tests of new drugs. The protocol includes morphological, microstructural and functional acquisitions, which can be performed longitudinally on the same subject with advantages from an ethical point of view. This project has generated a large amount of data that is currently still being analyzed.

## CONCLUSIONS

The current scenario of MS therapies is still largely inadequate and justifies the research for new treatments. Our project has developed a neuroimaging acquisition protocol that could be included in the preclinical efficacy tests of new drugs/therapies, allowing to evaluate their therapeutic efficacy on functional reorganization. The results of our project pave the way for the application of functional techniques to the preclinical research for new therapeutic approaches.

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 8 mesi) e per l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 8 months) and the amount of € 30,000

# Combinando Morfometria basata sui Voxel della Tomografia a Coerenza Ottica e Potenziale Evocato Visivamente Multifocale per studiare demielinizzazione e neurodegenerazione della sclerosi multipla



## Su-Chun Huang

Unità di Neurofisiologia Sperimentale, Istituto di Neurologia Sperimentale-INSPE, Istituto Scientifico e Policlinico Universitario San Raffaele, Milano, Italia

MENTORE/MENTOR  
**Letizia Leocani**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è conosciuta come malattia autoimmune in cui la risposta immunitaria causa demielinizzazione e neurodegenerazione. Sfortunatamente, i meccanismi molecolari che connettono infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione rimangono ancora sconosciuti.

Il sistema visivo, vulnerabile alla SM, può essere utilizzato come piattaforma per studiare la neurodegenerazione e la demielinizzazione con metodi non invasivi. La neurodegenerazione può essere misurata a livello della macula, tramite la tomografia a coerenza ottica (OCT), valutando l'assottigliamento dello strato di fibre nervose retiniche (RNFL). In altro modo invece, la demielinizzazione può essere rilevata tramite l'aumento di latenza dei potenziali evocati visivi multifocali (PEVmf).

Mentre la classica analisi delle immagini dell'OCT offre come risultato un solo valore medio, la morfometria basata sui voxel (MBV) permette una comparazione dei singoli voxel con l'intera immagine controllando contemporaneamente i fattori confondenti. L'aumento di sensibilità di questo nuovo metodo nel rilevare piccole lesioni, permetterà di trattare i risultati di OCT come delle mappe piuttosto che come un singolo numero. Quindi MBV permetterà di dividere le immagini di OCT in diversi settori e, basandosi sulla mappa dopo grafica dei PEVmf, effettuare delle correlazioni più specifiche tra le misure. Questa nuova analisi fornirà risultati dettagliati sulle relazioni tra demielinizzazione e neurodegenerazione.

Lo scopo di questo progetto è sviluppare un metodo MBV analitico da applicare alle immagini di OCT per capire se esiste un pattern comune di neurodegenerazione nei pa-

zienti SM. Il primo obiettivo sarà identificare le zone della retina più vulnerabili alla neurodegenerazione precoce. Il secondo sarà effettuare delle correlazioni tra i settori ottenuti con l'OCT e i risultati dei PEVmf ottenuti dai diversi canali registranti. Infine i dati ottenuti dopo un anno saranno raccolti e analizzati per seguire l'evoluzione temporale della relazione tra demielinizzazione e neurodegenerazione.

### RISULTATI

Il primo passo è stato quello di elaborare l'MBV con l'analisi statistica a livello di voxel. Una criticità di questa analisi riguarda i confronti multipli, controllati tramite l'opzione della proporzione di falsi positivi (false discovery rate - FDR) e con l'utilizzo delle statistiche TFCE (threshold-free cluster enhancement). Per giustificare lo spostamento tra il campo recettivo e le cellule gangliari della retina (RGC) della macula è stata eseguita una correzione, così da generare una mappa topografica tra i settori della macula sull'immagine di OCT e i corrispondenti canali del PEVmf. Il MBV-OCT è stato applicato su 4 gruppi di pazienti SM con nuova diagnosi, e soggetti sani (HC). In questo studio, sono stati arruolati solo pazienti SM con un valore normale dello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL) peripapillare, e senza storia clinica di neurite ottica. Durante l'analisi comparativa, sono stati considerati i parametri di spessore della retina locale, l'età, la durata della malattia e il livello di disabilità. È importante notare che, rispetto ai soggetti sani, in tutti i gruppi di SM è stata rilevata atrofia del GCIPL e l'ispessimento dello strato interno nucleare (INL), mentre l'atrofia del RNFL è stata riscontrata solo nei pazienti con diagnosi progressiva primaria e secondaria

(SMPP&SMSP).

Sorprendentemente, i pazienti con SM recidivante-remittente (SMRR) e SMSP hanno mostrato diversi schemi di danno nella macula. Nello specifico, è stata rilevata atrofia del RNFL nella SMSP, con un pattern simile a quello trovato nella SMPP, ma non nei pazienti con SMRR. Inoltre, l'atrofia del GCIPL nella SMRR era diversa da quella riscontrata nella sindrome clinica isolata (SCI), in quanto nella SMRR l'atrofia è risultata a livello della macula nasale e inferiore. Nel follow-up dello studio, il livello di atrofia degli strati RNFL e GCIPL era maggiore nei pazienti con SMRR e SMSP, mentre è rimasto stabile in SMPP e SCI.

Per quanto riguarda la relazione tra i settori della mappa morfologica OCT e i canali dei PEVmf, la correlazione tra latenza prolungata del PEVmf alla baseline e l'assottigliamento del GCIPL nel follow-up era evidente solo nella SMSP. Diversamente, nella SMPP una minore ampiezza alla baseline era correlata con uno strato GCIPL più sottile e un INL più spesso nel follow-up. I risultati implicano che nella fase progressiva, l'infiammazione continua sottostante presente nel percorso visivo possa aver provocato la perdita neuronale nella retina.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati sottolineano che nell'ambito della neurodegenerazione tipica della SM, la retina è un bersaglio primario. Successivamente, durante la progressione della malattia, i continui stati di infiammazione e demielinizzazione portano a una neurodegenerazione secondaria, ulteriormente facilitando la velocità di perdita assonale e neuronale.

Il monitoraggio dell'andamento dei livelli di atrofia nella macula dimostrato con l'applicazione del metodo MBV-OCT, ha il potenziale di divenire un biomarker che non solo possa aiutare a differenziare la malattia in fase precoce, ma anche per contemplare la prognosi nella pratica clinica.

La combinazione di MBV-OCT con PEVmf potrebbe diventare uno strumento per valutare la relazione tra demielinizzazione e neurodegenerazione in vivo, offrendo misura quantitative per studi clinici mirati al trattamento della neurodegenerazione.

# Combining Voxel-Based Morphometry of Optical Coherence Tomography and Multifocal Visual Evoked Potential to study the relationship between demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Demyelination and neurodegeneration follow the inflammation caused by autoimmune responses are the two important features of multiple sclerosis (MS). However, a comprehensive understanding of the mechanisms among inflammation, demyelination, and neurodegeneration in MS is still unclear.

The visual system is vulnerable to MS hence can be used as a platform to study neurodegeneration and demyelination non-invasively. The former can be measured with optical coherence tomography (OCT) at the macula, as thinning of ganglion cell layer/inner plexiform layer (GCIPL) and retinal nerve fiber layer (RNFL), while the latter can be measured as prolonged latency in multi-focal visual evoked potential (mfVEP).

Compared with the traditional OCT analysis that offers only average values, voxel-based morphometry (VBM) enables voxel-wise comparisons of the whole OCT image

while controlling confounding factors. This advances the sensitivity in detecting small lesions since the OCT results will be viewed as a Map rather than a number. Further, VBM will allow us to divide OCT images into sectors based on their topological relationship with mfVEP channels and perform sector-to-channel correlations. This analysis will provide detailed investigations of relationships between demyelination and neurodegeneration.

In this project, I aimed to develop VBM analytical tools for OCT images, to search if there exists common patterns of neurodegeneration in people with MS (pwMS). To identify the most vulnerable area in early neurodegeneration. Also, perform sector-to-channel correlation between OCT and mfVEP. In the end, follow-up data was collected after a year to further clarify the temporal evolution of the interrelationship of demyelination and neurodegeneration in MS.

## RESULTS

The pipeline for VBM and voxel-wise statistical analysis were generated. Multiple comparisons, a critical issue of voxel-wise analysis, was corrected with controlling of False discovery rate (FDR) and threshold-free cluster enhancement (TFCE). The displacement between the receptive field and the macula retinal ganglion cells (RGCs) were corrected so that the topographical map between sectors of macula OCT and their corresponding mfVEP channels was generated. The VBM-OCT was applied to 4 groups of newly-diagnosed PwMS and the healthy subjects (HC). Only PwMS with normal global peripapillary RNFL value and eyes without histories of optic neuritis were enrolled. Local retina thickness, age, disease duration, and disability level were controlled when conducted the comparisons. Interestingly, GCIPL atrophy and INL thickening were detected in all the pwMS groups compared with HC, while RNFL atrophy only in primary and secondary progressive groups (PPMS&SPMS).

Surprisingly, the relapsing-remitting (RRMS) and SPMS showed different patterns of axonal and neuronal injury in the macula. Especially that RNFL atrophy was absent in RRMS, while it was detected in SPMS, with a pattern similar to what was found in PPMS. Furthermore, the GCIPL atrophy in RRMS was different from what was found in clinical isolated syndrome (CIS), the former showed more

atrophy in the nasal and inferior macula. In the follow-up, RRMS and SPMS showed more RNFL and GCIPL atrophy, while the atrophy level remained stable in PPMS and CIS.

When performing sector-to-channel correlation, only in SPMS, prolonged baseline latency of mfVEP was correlated with thinner GCIPL at follow-up. On the other hand, lower baseline mfVEP amplitude in PPMS was correlated with thinner GCIPL and thicker INL at follow-up. The results implying that in the progressive phase, smoldering inflammation among the visual pathway resulted in neuronal loss in the retina.

## CONCLUSIONS

Our results support that retina is a primary target of neurodegeneration in MS. As the disease evolves, continuous inflammation/demyelination cause secondary neurodegeneration, and facilitates its speed.

The macula atrophy patterns demonstrated with VBM-OCT can be developed into biomarkers that can not only assist disease differentiating at an early stage, but also speculate prognosis for daily practice.

The combination of VBM-OCT with mfVEP could be developed into a tool to evaluate the relationship between demyelination and neurodegeneration in vivo, offering quantitative outcome measures for clinical trials targeting neurodegeneration.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Huang SC, Pisa M, Guerrieri S, Dalla Costa G, Esposito F, Leocani L. Increase Sensitivity in Detecting Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: a Voxel-Based Morphometry Study with Optical Coherence Tomography. Oral Presentation, 1° Annual Meeting della Rete IRCCS delle Neuroscienze e della Neuroriabilitazione, 2020
- Huang SC, Pisa M, Guerrieri S, Dalla Costa G, Esposito F, Leocani L. Increase Sensitivity in Detecting Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: a Voxel-Based Morphometry Study with Optical Coherence Tomography. Traditional Poster, MSVirtual 2020, The 8th Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting, 2020
- Huang SC, Pisa M, Guerrieri S, Dalla Costa G, Esposito F, Leocani L. Patterns of Neurodegeneration in Macula Differs in Multiple Sclerosis Subtypes: a Voxel-Based Morphometry Study with Optical Coherence Tomography. Traditional Poster, 35th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Stockholm, Sweden, 2019

**Borsa di Studio Senior finanziata con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 68,000 €**  
Senior Research Fellowship funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years and the amount of € 68,000

# Il contributo della riserva cognitiva nei pazienti con sclerosi multipla: uno studio di EEG ad alta densità



## Sara Baldini

Clinica Neurologica, Ospedale Universitario Cattinara, ASUGI, Università di Trieste, Trieste, Italia

MENTORE/MENTOR

**Paolo Manganotti**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa la cui evoluzione, in termini di disabilità fisica e cognitiva, è variabile e difficilmente prevedibile. Differenti traiettorie di progressione sono spiegate solo in parte da una diversa attività della malattia. Questo ha determinato un crescente interesse nello studio del funzionamento del cervello, investigando possibili alterazioni delle reti neurali a larga scala. Una metodica non invasiva che consente lo studio di questi network è l'utilizzo dell'EEG ad alta densità. Il nostro studio mira a investigare la dinamica temporale delle reti neurali a larga scala, in condizioni di riposo, nelle persone con SM, attraverso l'analisi dei microstati. In questo approccio, l'EEG è letto come una serie temporale di fluttuazioni di mappe di voltaggio con una specifica configurazione spaziale (aree con potenziali positivi vs aree con potenziali negativi). Tra di esse è possibile identificarne alcune che rimangono stabili per circa 80-120 msec; queste mappe sono state chiamate microstati. In letteratura è possibile trovare numerosi lavori che identificano almeno quattro mappe con differenti topografie: Mappa-A, associata al network acustico; Mappa-B, associata al network visivo; Mappa-C, associata al network della salienza; Mappa-D, associata al network dell'attenzione e del riorientamento. Tuttavia il numero dei microstati è molto dibattuto e recentemente sono state identificate altre mappe associate a differenti network cerebrali. L'obiettivo di questo studio è identificare un set di microstati specifico per la SM, correlabile con parametri clinici e neuropsicologici. L'alterazione nella dinamica temporale dei microstati potrebbe rappresentare un potenziale marker di gravità della malattia.

### RISULTATI

Nel nostro studio abbiamo analizzato 75 EEG ad alta densità così suddivisi: 50 per i pazienti con SM e 24 per il

gruppo controllo costituito da persone sane; i gruppi erano equilibrati per età e genere. L'analisi dei microstati ha permesso di ottenere sei mappe rappresentative dell'attività EEG, in condizioni di riposo, per tutti le persone coinvolte nello studio: Mappa-A, Mappa-B, Mappa-C, Mappa-D, Mappa-E (associata ad aree attribuite al Default Mode Network - DMN) e Mappa-F (associata al network della salienza). L'osservazione a livello dei singoli gruppi ha evidenziato un'interessante differenza: la Mappa-E era presente solo nei pazienti con SM mentre la Mappa-F era presente solo nel gruppo controllo. Le nostre analisi si sono basate su tutte e sei le mappe identificate. L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha evidenziato significative differenze in vari parametri dell'attività temporale delle mappe. I parametri analizzati sono stati: i) Global Explained Variance (GEV; un indice globale di quanto la mappa spieghi l'attività EEG), ii) Durata Media (DM; la media in msec di presenza continuativa della mappa), iii) Copertura Temporale (CT; la percentuale di tempo totale occupato dalla mappa) e iv) la frequenza di comparsa della mappa (Frequ.). I risultati ottenuti hanno mostrato un significativo aumento della presenza della Mappa-A ( $p < 0.001$ ), B ( $p < 0.001$ ) ed E ( $p < 0.001$ ) nelle persone con SM rispetto alle persone del gruppo controllo. Inoltre, la Mappa-D ( $p < 0.001$ ) e F ( $p < 0.001$ ) riportavano invece una significativa riduzione della loro dinamica temporale nei pazienti con SM rispetto ai controlli. Nessuna differenza è stata osservata per la Mappa-C (associata ad aree posteriori del DMN). L'indice di ricadute annuali è risultato positivamente associato alla Frequ. della Mappa-B ( $r = 0.348$ ,  $p = 0.013$ ) e con il GEV ( $r = 0.331$ ,  $p = 0.019$ ) e la CT ( $r = 0.281$ ,  $p = 0.048$ ) della Mappa-E. Infine, l'8% dei pazienti con SM mostrava una difficoltà cognitiva (misurata con Brief International Cognitive Assessment for Multiple Sclerosis - BICAMS) e la regressione multipla lineare ha rilevato una forte predizione dei punteggi nel test Symbol

Digit Modalities (SDMT) da parte del GEV della Mappa-A ( $p=0.017$ ; 11.2%).

## CONCLUSIONI

Il nostro studio ha dimostrato come nei pazienti con SM, rispetto alle persone sane, sia rilevabile un pattern caratterizzato da un aumento della dinamica temporale dei microstati associati ai network sensoriali e una diminuzione invece in quelli associati ai network cognitivi. Emerge anche un interessante coinvolgimento dei microstati as-

sociati ad aree del DMN, suggerendo un differente coinvolgimento di questo nella SM. La correlazione positiva tra la Mappa-B ed E con l'indice di ricadute annuali così come tra la Mappa-A e il test SDMT, uno tra i più sensibili nel cogliere un declino cognitivo nelle persone con SM, hanno permesso di ipotizzare potenziali marker dell'attività della malattia. Infine, questa specifica combinazione della dinamica temporale dei microstati potrebbe rappresentare una firma elettrofisiologica di un malfunzionamento di alcuni nodi principali relativi a network di larga scala.

# Investigating relationships between high-density electroencephalography microstates and cognitive reserve in patients with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) has a highly variable course and disabling symptoms even in absence of associated imaging data. This clinical-radiological paradox has motivated functional studies with particular attention to the resting-state networks by fMRI. The EEG microstates analysis might offer advantages to study the spontaneous fluctuations of brain activity. This analysis investigates configurations of voltage maps that remain stable for 80-120 milliseconds, termed microstates. In literature, the existence of at least four prototypical topographies (microstates) is quite consistent. EEG/fMRI recordings have showed that in healthy subjects these microstates could be associated with the Blood Oxygenation Level Dependent (BOLD) pattern of established resting-state networks: microstate Class A with auditory network, Class B with visual network, Class C with salience network and Class D with attention network. In recent works also other maps have been described. In this study, we aimed to investigate the temporal dynamic of large-scale networks in resting-state condition by means of a high-density EEG (hdEEG) in patients with Relapse-Remitting MS (RRMS) compared with healthy subjects. In particular, we pointed to identify a specific set of microstates in both populations. Finally, we planned to correlate the temporal dynamics with clinical and neuropsychological parameters. We hypothesize that altered microstates may represent a potential surrogate marker of MS severity.

## RESULTS

We analyzed 75 hdEEG subdivided in: 50 for patients with RRMS and 24 for healthy controls; these groups were matched for age and gender. The microstates analysis showed six templates representative of the EEG activity, in rest condition, across all subjects: microstate Class A, Class

B, Class C, Class D, Class E (associated to areas attributed to the Default Mode Network - DMN) and Class F (associated with the salience network). The same analysis at the level of the individual groups highlighted an interesting difference: microstate Class E was present only in patients with MS while Class F was present only in the group of healthy people. Our analyzes were based on the six identified microstates; then two-way ANOVA for repeated measures showed significant differences in four variables of their temporal activity. The parameters analyzed were: i) Global Explained Variance (GEV; a ratio of how well each template described the whole data), ii) Mean Duration (MD; the averaged amount of time in msec that a microstate was continuously present), iii) Time Coverage (TC; the percent of total time that a microstate was present) and iv) the frequency of occurrence (Frequ.). The findings showed an increase in the presence of microstates Class A ( $p < 0.001$ ), B ( $p < 0.001$ ) and E ( $p < 0.001$ ) in patients with MS compared to the control group. On the other side, the microstates Class D ( $p < 0.001$ ) and F ( $p < 0.001$ ) reported a significant reduction in their temporal dynamics in patients with MS that observed in the control group. No difference was found for microstate Class C (associated with posterior areas of the DMN). The annual relapse rate (ARR) was positively associated with the Frequ. of microstate Class B ( $r = 0.348$ ,  $p = 0.013$ ) and with the GEV ( $r = 0.331$ ,  $p = 0.019$ ) and the TC ( $r = 0.281$ ,  $p = 0.048$ ) of microstate Class E. Finally, eight percent of patients with MS were found cognitively impaired (measured by the Brief International Cognitive Assessment for Multiple Sclerosis - BICAMS) and the multiple linear regression analysis showed a strong prediction of Symbol Digit Modalities Test (SDMT) score by GEV of microstate Class A ( $p=0.017$ ; 11.2%).



## CONCLUSIONS

Our study demonstrates, in patients with RRMS, a dualism between increased sensory and decreased cognitive patterns of microstate in terms of temporal dynamic. Interestingly, two unusual topographies, one specific for patients with MS (microstate Class E) and one specific for control group (microstate Class F) were also found. Besides, a different involvement of microstates associated to DMN (as Class C and Class E) might suggest a distinct implication of

this network in MS. Finally, the significant positive correlation between ARR and microstate Class B and E as well as between microstate Class A and SDMT, one of the most sensitive tasks in MS for cognitive decline detection, might suggest potential markers of disease activity. This specific combination of the temporal dynamic of microstates might represent an electrophysiological signature of an overloaded and/or failed hubs functioning, which could contribute to explain the clinical-radiological paradox.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *37th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis ECTRIMS 2021, The Digital Experience, 13-15 October 2021*
- *Congresso Scientifico Annuale Aism e la sua Fondazione (FISM) 2021, Roma, 26-28 Ottobre 2021*

**Borsa di Studio Senior finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 32.300 €**  
Senior Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year and the amount of € 32,300

---

# **Neuroriabilitazione e qualità della vita**

Neurorehabilitation  
and quality of life

---



# Costi della comorbidità in persone con sclerosi multipla



## Roberto Bergamaschi

Centro Sclerosi Multipla, IRCCS Fondazione Mondino, Pavia, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Giulia Mallucci, Eleonora Rigoni, Sara Fusco**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Michela Ponzio, Andrea Tacchino**, Area Ricerca Scientifica, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova, Italia

**Giampaolo Brichetto, Ambra Sansone**, Servizio di Riabilitazione Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova, Italia

**Cristina Montomoli, Maria Cristina Monti, Paola Borrelli, Joana Popa**, Unità di Biostatistica e Epidemiologia, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università degli studi di Pavia, Pavia, Italia

**Filippo Ansaldo, Daniela Amicizia**, Unità di Programmazione Sanitaria, Azienda Ligure Sanitaria (A.Li.Sa), Genova, Italia

**Pietro Perotti**, Agenzia di Tutela della Salute - ATS, Pavia, Italia

**Mario Alberto Battaglia**, Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Siena, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM), come altre patologie croniche, può associarsi a varie malattie (comorbidità). Le comorbidità hanno sicuramente un impatto negativo sulla SM in quanto, in loro presenza, la diagnosi può essere ritardata, la disabilità neurologica progredisce più rapidamente, l'inizio e la gestione delle immunoterapie risultano condizionati, la qualità di vita è significativamente peggiore. Benché in altre patologie croniche (diabete, cardiopatie, disturbi psichiatrici) sia già stato dimostrato che la presenza di comorbidità comporti "costi" di malattia molto più elevati, nell'ambito della SM sono relativamente pochi gli studi affidabili sul "costo" della SM associata a comorbidità.

Lo studio si è proposto di ampliare le conoscenze sull'impatto della comorbidità nella SM e sul sistema socio-sanitario attraverso il raggiungimento dei seguenti obiettivi: identificare la prevalenza delle principali comorbidità nelle persone con SM (pSM) in aree ben identificate, utilizzando sia dati ospedalieri che amministrativi; calcolare i costi diretti in pSM con comorbidità; comparare la prevalenza e i costi della comorbidità nella SM in due diverse province italiane (Pavia e Genova); rilevare l'impatto della comorbidità in termini di qualità di vita, di attività fisica, di attività lavorativa.

## RISULTATI

Abbiamo reclutato un campione di 755 pSM: 284 (37,6%) afferenti al Centro SM della Fondazione IRCCS Mondino di Pavia, e 471 (62,4%) afferenti al Centro Riabilitativo AISM Liguria di Genova. Il 67,5% erano femmine (senza differenze significative tra Pavia e Genova). Le pSM di Genova erano più anziane (età media del gruppo di Pavia 50 anni vs età media di Genova 55 anni). Il 50,6% delle pSM era attualmente impiegato (con differenze significative tra Pavia e Genova, 65,5% vs 41,6%, rispettivamente). La durata media della malattia era di 34,7 anni. Il 90% presentava una forma recidivante-remittente e un punteggio EDSS mediano di 3,0. Le pSM residenti a Genova, rispetto alle pSM residenti a Pavia avevano percentuali significativamente più alte di forme progressive (primarie 10% vs 1,8%, secondarie 36,6% vs 8,1%), una durata di malattia più lunga (media 35,9 vs. 32,8 anni) e un livello di disabilità più elevato (EDSS mediana 4,0 vs. 2,0).

La presenza di almeno una comorbidità è stata identificata in 406 (53,8%) pSM. Le sei comorbidità più frequenti sono state: ipertensione (19,9%), depressione (17,1%), ansia (12,5%), malattie autoimmuni (9,8%), iperlipidemia (8,2%) e cancro (5%). Il rischio di avere almeno una comorbidità era significativamente più basso tra i maschi, e più elevato

nelle pSM genovesi e con età più avanzata. Le analisi dei costi sono state effettuate come costi integrati ottenuti sommando le singole voci. I costi sanitari sono stati calcolati facendo riferimento alle tariffe del Sistema Sanitario Nazionale per le prestazioni ospedaliere e ambulatoriali e prescrizioni di farmaci (solo costi diretti). Il costo medio annuo dell'assistenza sanitaria diretta per un paziente con SM era di 3.061 €. I costi sanitari diretti mediani erano significativamente più elevati per gli individui con comorbidità (4.057,7 € vs 1.949,0 €), mostrando il 52% dei costi aggiuntivi.

L'influenza delle comorbidità sulla qualità della vita delle pSM è stata valutata attraverso il questionario EQ-5D-3L che ha mostrato problemi in un'ampia percentuale di pSM (67,3% dolore/disagio, 62,2% attività abituali, 59,8% mobilità, 56,8% ansia/depressione); la qualità della vita era significativamente più compromessa nelle pSM con comorbidità.

Difficoltà lavorative, valutate utilizzando il questionario MSQ-Job, sono state osservate in una percentuale maggiore nelle pSM con comorbidità. La presenza di almeno

una comorbidità è risultata un forte predittore di difficoltà legate al lavoro, insieme al genere e ai livelli di istruzione e disabilità.

Solo la minoranza di pSM (24,66%) ha dichiarato di praticare al momento dell'intervista qualsiasi tipo di attività fisica. L'attività fisica era significativamente meno frequente nel gruppo dei pazienti con almeno una comorbidità rispetto a quelli senza comorbidità.

## CONCLUSIONI

Il nostro progetto ha consentito di ampliare le conoscenze sull'impatto delle comorbidità nella SM, con rilevanza sia per le pSM che per il sistema sanitario. Il nostro studio, che ha confermato la notevole frequenza di comorbidità nelle pSM, è il primo a documentare il carico delle comorbidità in un'ampia coorte di pazienti italiani, non solo in termini di costi diretti per il sistema sanitario, ma anche di impatto sulla qualità della vita e sull'attività fisica e lavorativa. Attraverso le nostre analisi è stato possibile evidenziare come i dati amministrativi siano utilizzabili, anche per mostrare differenze tra diverse realtà regionali.

# Costs of comorbidity in people with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS), like other chronic diseases, can be associated with various comorbidities.

Comorbidities certainly have a negative impact on MS as, in their presence, the diagnosis can be delayed, the neurological disability progresses more rapidly, the initiation and management of immunotherapies are conditioned, and the quality of life is worse. Although in other diseases (diabetes, heart diseases, psychiatric disorders) it has already been shown that the presence of comorbidities leads to much higher disease "costs", in the context of MS there are relatively few reliable studies on the "cost" of MS associated with comorbidities.

The study aimed to broaden the knowledge on the impact of comorbidity on MS and on the socio-health system, through the achievement of the following objectives: to identify the prevalence of the main comorbidities in persons with MS (pwMS) in well-identified areas, using both hospital and administrative data; to calculate direct costs in persons with MS and comorbidities; to compare the prevalence and costs of comorbidities in MS in two different Italian provinces (Pavia and Genoa); to evaluate the impact of comorbidities in terms of quality of life, of physical activity, of working activity.

## RESULTS

We recruited a sample of 755 pwMS: 284 (37.6%) pwMS

referred to the MS Center at the IRCCS Mondino Foundation, Pavia, and 471 (62.4%) referred to the AISM-Rehabilitation Centre of Liguria, Genoa. 67.5% were females (without significant differences between Pavia and Genoa). Genoa pwMS were older (Pavia median age was 50 years vs Genoa median age 55 years). 50.6% pwMS were currently employed (with significant differences between Pavia and Genoa, 65.5% vs 41.6%, respectively). Mean disease duration was 34.7 years. 90% of the subjects had relapse-remitting form and a median EDSS score of 3.0. PwMS living in Genoa, in comparison with pwMS living in Pavia, have significantly higher percentage of progressive forms (primary 10% vs. 1.8%, secondary 36.6% vs. 8.1%), longer disease duration (mean 35.9 vs. 32.8 years) and higher disability level (median EDSS 4.0 vs. 2.0).

Presence of at least a comorbidity was identified in 406 (53.8%) pwMS. The six most reported comorbidities were: hypertension (19.9%), depression (17.1%), anxiety (12.5%), autoimmune diseases (9.8%), hyperlipidemia (8.2%) and cancer (5%). The risk of having at least a comorbidity was significantly less likely among males, and more likely in the Genoa area and among older age.

The cost analyzes were carried out as costs obtained by adding the individual items. Healthcare costs were established by referring to the rates of the National Health System. The mean annual direct healthcare cost of a pMS was 3,061€. The median direct healthcare costs were signifi-

cantly higher for individuals with comorbidity (4,057.7€ vs 1,949.0€), showing 52% of additive costs.

The influence of comorbidities on health-related quality of life in pwMS was evaluated through EQ-5D-3L questionnaire that showed problems for a large proportion of pwMS (67.3% pain, 62.2% usual activities, 59.8% mobility, 56.8% anxiety/depression); quality of life was significantly more impaired in pwMS with comorbidities.

Job difficulties, assessed using the MSQ-Job questionnaire, were observed in a higher percentage in pwMS with comorbidity. The presence of at least one comorbidity resulted as strong predictor of work-related difficulties together with gender, educational and disability levels.

The minority of pwMS (24.66%) stated to practice any kind of physical activity at the time of the interview. Physical activity was significantly less frequent within the group of

patient with at least one comorbidity with respect to ones without comorbidity.

## CONCLUSIONS

This project has expanded knowledge on the impact of comorbidities in pwMS, which is relevant both for pwMS and for the health care system. In particular, our study confirmed the considerable frequency of comorbidities in pwMS. It is the first to document the burden of comorbidities in a large cohort of Italian patients, not only in terms of direct costs for the health care system, but also of impact on the quality of life and on physical and working activity. Through our analyzes it was possible to highlight how administrative data can be useful, and to show differences between different regional realities.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Mallucci G, Ponzio M, Borrelli P, Monti MC, Fusco S, Rigoni E, Amicizia D, Brichetto G, Perotti P, Battaglia MA, Piazza MF, Silva S, Ansaldo F, Montomoli C, Bergamaschi R. Comorbidity in people with multiple sclerosis. A cross-sectional study in two Italian areas. XXV World Congress of Neurology, Rome/Web 3-7 October 2021
- Monti MC, Mallucci G, Ponzio M, Borrelli P, Rigoni E, Fusco S, Amicizia D, Brichetto G, Perotti P, Battaglia MA, Piazza MF, Silva S, Ansaldo F, Montomoli C, Bergamaschi R. Administrative data to estimate the burden of major comorbidities in multiple sclerosis. A cross-sectional study in two Italian areas. XXV World Congress of Neurology, Web 3-7 October 2021
- Monti MC, Borrelli P, Ponzio M, Mallucci G, Paganino C, Brichetto G, Perotti P, Silva S, Battaglia MA, Ansaldo F, Fusco S, Rigoni E, Bergamaschi R, Montomoli C. Prevalence and economic burden of major comorbidities in multiple sclerosis. - SI-SMEC- XI Congresso Nazionale Società Italiana Statistica Medica Epidemiologia Clinica, Web 15-18 September 2021
- Ponzio M, Borrelli P, Monti MC, Amicizia D, Perotti P, Silva S, Ansaldo F, Mallucci G, Bergamaschi R, Montomoli C. Prevalence and economic burden of major comorbidities in multiple sclerosis. XIV European Public Health Congress (EPHC), Web 10-12 November 2021

### Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 18 mesi) e l'ammontare di 100.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 18 months) and the amount of € 100,000

# Identificazione dei disturbi precoci del cammino in persone non disabili con SM: valutazione clinico-strumentale della progressione della malattia e di potenziali interventi terapeutici



## Davide Cattaneo

*IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Milano; Department of Pathophysiology and Transplantation Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Elisa Gervasoni, Denise Anastasi, Marco Rovaris, Cristina Grosso, Maurizio Ferrarin, Ilaria Carpinella, Marco Rabuffetti**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Giampaolo Brichetto, Andrea Tacchino, FISM, Area Ricerca Scientifica, Genova, Italia**  
**Claudio Solaro, Rachele Di Giovanni, CRRF Mons. Luigi Novarese, Moncrivello (VC), Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Recenti studi hanno mostrato che i deficit del cammino e dell'equilibrio possono essere presenti e progredire anche nel tempo in persone con diagnosi recente di sclerosi multipla (SM). Tale risultato evidenzia l'importanza di effettuare studi longitudinali per documentare l'andamento di queste funzioni motorie già dall'esordio della malattia. Inoltre, è importante studiare la presenza di fattori prognostici per individuare le persone che potrebbero essere più ad alto rischio di progressione dei sintomi. A questo scopo vi è la necessità di creare una batteria di valutazioni sensibili anche a piccoli cambiamenti, così da poter evidenziare già nelle prime fasi di malattia eventuali disturbi subclinici del sistema motorio e prevenirne la progressione, prima che si manifestino a livello clinico. Nuovi sistemi di misura indossabili e poco costosi, oggi a disposizione per la valutazione del cammino e dell'equilibrio, sembrano in grado di fornire dati quantitativi e oggettivi, più sensibili delle scale cliniche, soddisfacendo questa necessità. L'identificazione dei fattori prognostici di progressione della malattia può, tuttavia, essere poco utile se non associata alla definizione di un intervento preventivo. Le attuali conoscenze sulle terapie farmacologiche disponibili incoraggiano interventi precoci, accoppiati con un intervento riabilitativo per ottimizzare i risultati clinici a lungo termine.

La riabilitazione su tapis roulant è una metodica larga-

mente utilizzata su persone con SM che hanno un grado di disabilità lieve-moderato. Questo approccio si candida anche per il trattamento di pazienti con diagnosi precoce al fine di prevenire il peggioramento del cammino e dell'equilibrio.

Gli obiettivi del presente studio sono stati quindi quelli di valutare la presenza e l'evoluzione di disturbi subclinici della marcia e dell'equilibrio in stazione eretta, in persone con SM che non presentano disabilità, anche al fine di identificare variabili che potrebbero predire la progressione della patologia e verificare l'effetto di un trattamento su tapis roulant nella prevenzione dei disturbi della marcia e dell'equilibrio.

## RISULTATI

Nel corso dello studio sono state reclutate 82 persone con SM con diagnosi da massimo 5 anni e assenza o minima disabilità, che sono state valutate al reclutamento, dopo un anno e dopo 2 anni, in 3 differenti centri del nord Italia. Durante le valutazioni sono stati effettuati test su cammino, equilibrio, manualità, funzioni cognitive, fatica e qualità della vita.

I risultati hanno mostrato che i partecipanti presentano già deficit funzionali alla valutazione iniziale, meglio caratterizzati dalla valutazione strumentale, con maggiore prevalenza di deficit motori, come l'endurance del cammino e l'equilibrio, rispetto a quelli cognitivi. Si è evidenziata nella

vita quotidiana una minore attività motoria vigorosa e una maggiore inattività.

I risultati dello studio longitudinale a 2 anni hanno invece mostrato una progressione significativa di malattia nel 25% dei pazienti considerando la scala di misura della disabilità EDSS, mentre in meno del 10% in tutti gli altri domini esplorati. Sulla base del decorso osservato è stato costruito un modello predittivo del deterioramento funzionale utilizzando tecniche di machine learning. È emerso che la destrezza manuale, la fatica percepita, la velocità del cammino e il genere, insieme a variabili strumentali che descrivono la qualità del cammino e la stabilità posturale, sono le principali caratteristiche che predicono un buon decorso della malattia a 2 anni. Un risultato interessante che però andrebbe confermato con analisi più approfondite seguendo queste persone per un periodo di tempo maggiore.

Infine, abbiamo condotto uno studio pilota, in un sottogruppo di 44 pazienti con basso livello di attività fisica, randomizzati in un gruppo sperimentale e un gruppo di controllo. Il gruppo sperimentale ha eseguito un protocollo di allenamento su tapis roulant con esercizi aerobici e

di equilibrio, mentre il gruppo di controllo ha continuato le normali attività. A fine studio l'endurance nel cammino non ha mostrato differenze tra i gruppi. Tuttavia, abbiamo riscontrato una riduzione clinicamente significativa della fatica e un miglioramento della qualità dell'andatura misurata da variabili strumentali a favore del gruppo sperimentale.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio evidenziano la presenza di piccoli deficit subclinici della funzione motoria già alla diagnosi, suggerendo l'utilizzo di sistemi di valutazione strumentale che permettano di verificarne o meno la presenza e monitorarne evoluzione, se presente. Analisi preliminari sembrano suggerire che l'utilizzo di dati clinici e strumentali in grado di analizzare lo stile di vita, la qualità del cammino e la gestione della fatica possano fornire indicazioni sul decorso della malattia.

Infine, i risultati dello studio pilota suggeriscono che un trattamento di prevenzione secondaria basato sul cammino su treadmill possa ridurre la fatica percepita durante le attività della vita quotidiana.

# Unraveling early walking dysfunction in non-disabled MS people: clinical and instrumental assessment of disease progression and potential therapeutic interventions

## INTRODUCTION AND AIMS

Recent studies have shown that walking and balance deficits increase over time, even in people with an early diagnosis of multiple sclerosis. This result highlights the importance of carrying out longitudinal studies to document the progress of motor functions over time. In addition, it is important to study the presence of prognostic factors of disease progression to identify people who are at the highest risk of worsening. For this purpose, a specific and sensitive assessment able to highlight subtle disorders of the motor system since the early stages of disease should be developed. Nowadays, new cheap and wearable technologies could provide quantitative and objective data, able to predict the evolution of the disease.

However, the identification of prognostic factors of disease progression can be useless without a definition of a preventive intervention. Current knowledge of available drug therapies encourages early, safe and well-tolerated interventions coupled with rehabilitative interventions to optimize long-term clinical outcomes.

Treadmill rehabilitation is a widely used method on people

with MS with a mild to moderate disability. This approach is also a candidate for the treatment of patients with early diagnosis in order to prevent the worsening of gait and balance disorders.

Therefore, the aims of this study were to assess the presence of subclinical walking and balance impairment using wearable devices in non-disabled people with MS (PwMS) and to identify potential prognostic factors associated to disease progression, and to set up a pilot study to investigate the effects of treadmill training in preventing the onset and worsening of walking impairments, balance deficits and fatigue.

## RESULTS

During this study, we recruited 82 PwMS, with a diagnosis less than 5 years and with no/minimal disability in 3 different centers in northern Italy. They were assessed at baseline, after one year and after 2 years. We performed tests on walking, balance, upper limb, and cognitive functions, fatigue, and quality of life.

Our cross-sectional analysis showed that most of partici-

pants presents functional deficits at baseline assessment better described by the instrumental assessment. Furthermore, we found a higher prevalence of motor, like walking endurance and balance, than cognitive deficits.

Moreover, the results of the 2-year longitudinal study showed a significant progression of the disease in 25% of PwMS measured by the EDSS, while in less than 10% in all the other functional domains. Based on these results, a predictive model of functional deterioration was constructed using modern machine learning techniques. It was found that manual dexterity, perceived fatigue, walking speed and gender, and walking quality and postural stability are the main characteristics to predict a good 2-year course of the disease and that instrumental assessment provided a useful set of predictors to combine with clinical predictors. However, this result should be confirmed by more specific analyses and longer follow-up period.

Finally, we conducted a pilot randomized control study in a subgroup of 44 PwMS. We randomized PwMS into an

experimental group and a control group. The experimental group performed a treadmill training protocol with aerobic and balance exercises, while the control group continued their normal activities. At the end of the study, we found no between group differences on walking endurance. However, PwMS in the experimental group showed a statistically significant reduction in fatigue and an improvement in the quality of gait measured by instrumental variables.

## CONCLUSIONS

Taken together, our results highlight the presence of sub-clinical functional deficits already at diagnosis, thus suggesting the use of instrumental evaluation to monitor the presence and the evolution of symptoms, if any. Instrumented and clinical assessment of lifestyle, walking features and fatigue management also can help in predicting the evolution of the disease. Finally, the results of the pilot study suggest a treadmill-based prevention treatment seems to reduce perceived fatigue in daily life.





## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Publications

- Cattaneo D, Gervasoni E, Anastasi D, Giovanni RD, Brichetto G, Carpinella I, Cavalla P, Confalonieri P, Groppo E, Prosperini L, Tacchino A, Rovaris M, Solaro C. Prevalence and patterns of subclinical motor and cognitive impairments in non-disabled individuals with early multiple sclerosis: a multicenter cross-sectional study. *Ann Phys Rehabil Med.* 2021 Nov 12;65(1):101491
- Carpinella I, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Tacchino A, Brichetto G, Confalonieri P, Rovaris M, Solaro C, Ferrarin M, Cattaneo D. Instrumentally assessed gait quality is more relevant than gait endurance and velocity to explain patient-reported walking ability in early stage Multiple Sclerosis. *Eur J Neurol.* 2021 Jul;28(7):2259-2268
- Caronni A, Gervasoni E, Ferrarin M, Anastasi D, Brichetto G, Confalonieri P, Di Giovanni R, Prosperini L, Tacchino A, Solaro C, Rovaris M, Cattaneo D, Carpinella I. Local Dynamic Stability of Gait in People With Early Multiple Sclerosis and No-to-Mild Neurological Impairment. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2020 Jun;28(6):1389-1396
- Mestanza Mattos FG, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Tacchino A, Brichetto G, Carpinella I, Confalonieri P, Vercellino M, Solaro C, Rovaris M, Cattaneo D. Assessing balance in non-disabled subjects with multiple sclerosis: Validation of the Fullerton Advanced Balance Scale. *Mult Scler Relat Disord.* 2020 Jul; 42:102085
- Carpinella I, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Tacchino A, Brichetto G, Confalonieri P, Vercellino M, Solaro C, Rovaris M, Ferrarin M, Cattaneo D. Walking with horizontal head turns is impaired in persons with early-stage Multiple Sclerosis showing normal locomotion. *Front Neurol.* 2022 Jan;28(12)

### Congress Presentations

- Mestanza Mattos F, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Prosperini L, Tacchino A, Brichetto G, Confalonieri P, Solaro C, Cattaneo D. How can we clinically assess balance in early diagnosed people with multiple sclerosis? RIMS-Sig mobility conference 2019 Tel Aviv
- Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Solaro C, Tacchino A, Brichetto G, Rovaris M, Confalonieri P, Prosperini L, Carpinella I, Rabuffetti M, Cattaneo D. Instrumented assessment of physical activity in early diagnosed People with Multiple Sclerosis. RIMS-Sig mobility conference 2019 Tel Aviv
- Caronni A, Gervasoni E, Ferrarin M, Anastasi D, Brichetto G, Confalonieri P, Di Giovanni R, Prosperini L, Tacchino A, Solaro C, Rovaris M, Cattaneo D, Carpinella I. Local dynamic stability of gait in people with early multiple sclerosis and minimal impairment. A cross-sectional study. SIAMOC conference 2019 Bologna
- Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Brichetto G, Carpinella I, Confalonieri P, Grosso C, Prosperini L, Tacchino A, Rovaris M, Solaro C, Cattaneo D. The trajectory of functional disorders in early diagnosed People with Multiple Sclerosis: 1-year follow-up study. RIMS conference 2020 Online
- Carpinella I, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Tacchino A, Brichetto G, Confalonieri P, Solaro C, Ferrarin M, Rovaris M, Cattaneo D. A single wearable inertial sensor detects subtle balance impairments in early-stage, normally walking people with Multiple Sclerosis. RIMS conference 2020 Online
- Carpinella I, Gervasoni E, Anastasi D, Di Giovanni R, Tacchino A, Brichetto G, Confalonieri P, Solaro C, Rovaris M, Ferrarin M, Cattaneo D. Balance deficits before walking impairments: a cross-sectional study on people with early Multiple Sclerosis. SIAMOC conference 2021 Online

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 110.000 €.**

Research project funded by FISM Grant (2016) for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 110,000.

# Metodi avanzati di analisi video per la diagnosi precoce, la valutazione quantitativa e il monitoraggio di deficit motori in persone con sclerosi multipla



## Maura Casadio

*Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, (DIBRIS),  
Università degli Studi di Genova, Genova, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Francesca Odone, Annalisa Barla, Matteo Moro, Giorgia Marchesi, Filip Hesse,  
Andrea Canessa**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Matilde Inglese, Maria Cellerino, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia,  
Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI), Università degli Studi di Genova, Genova, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'analisi del cammino è un prezioso ausilio ai clinici per caratterizzare e monitorare il movimento in presenza di problemi ortopedici e in persone con malattie neurologiche, come la sclerosi multipla (SM). Inoltre, può essere utilizzata per personalizzare trattamenti di riabilitazione appropriati e specifici. Le valutazioni quantitative garantiscono la ripetibilità e l'obiettività dell'analisi, in supporto alle osservazioni visive. Sistemi di motion capture (MoCap) basati su marker, per il loro alto livello di precisione, sono considerati il gold standard nella moderna analisi del cammino. Tuttavia, richiedono marker che siano attaccati al corpo della persona. Questo processo richiede tempo e può influenzare la naturalezza del movimento. Inoltre, sono costosi e richiedono personale esperto per applicare correttamente i marker e per elaborare i dati registrati, rendendo l'analisi dipendente dall'operatore e difficile da effettuare in ambienti naturali. Per queste ragioni recentemente ci si è focalizzati sullo studio di approcci più economici, veloci e semplici per caratterizzare il movimento umano. Tra le possibili alternative, i sistemi basati su sensori indossabili (come le unità di misura inerziali, IMU) sono meno costosi, ma soffrono degli stessi problemi degli approcci basati su marker.

Negli ultimi decenni, gli algoritmi di deep learning hanno fatto fare grandi passi avanti in computer vision sugli algoritmi di stima della posa senza marker e stanno aprendo la possibilità di adottare metodi efficienti per estrarre informazioni sul movimento a partire da comuni video RGB. Questo porta a chiedersi se tali approcci possano essere

adottati per un'accurata analisi del movimento umano e in particolare del cammino per applicazioni cliniche.

Le tecniche basate su video presentano molti vantaggi rispetto ai sistemi basati su marker: sono meno costose, non sono ingombranti e non influenzano la naturalezza del movimento. Quindi possono essere adottati per studiare il movimento umano in ambienti naturali. Infine, possono essere completamente automatici e, quindi, non dipendenti dall'operatore. Tuttavia, ci sono pochi studi che confrontano quantitativamente le informazioni estratte con tecniche video con quelle recuperate con sistemi gold standard basati su marker.

Con questo progetto miriamo a colmare questa lacuna confrontando sia i parametri spazio-temporali sia le variazioni degli angoli articolari durante il ciclo del passo, calcolati dai punti chiave estratti con queste due tecniche nello spazio 3D. Inoltre, siamo interessati all'applicazione del sistema senza marker per l'analisi del cammino in persone con SM.

## RISULTATI

In questo contesto, i principali contributi di questo progetto possono essere riassunti come segue:

- 1) Implementazione di una pipeline per l'analisi del cammino da video (markerless). La pipeline prende come input video RGB (punti di vista multipli della stessa scena) e dà come output i parametri cinematici solitamente calcolati nell'analisi del passo.
- 2) Confronto tra sistemi con e senza marker. Abbiamo testato l'affidabilità e la stabilità della pipeline implementata.



Per fare ciò, abbiamo acquisito 16 soggetti sani sia con un sistema basato su marker sia con un sistema di telecamere RGB multi-vista. Poi abbiamo calcolato i parametri spazio-temporali e cinematici del cammino sia con il sistema marker base che con la nostra pipeline implementata senza marker. Infine abbiamo confrontato i risultati dei due sistemi.

3) Analisi dell'andatura di persone con SM. Con il nostro sistema markerless abbiamo acquisito e studiato l'andatura di 30 partecipanti con SM (22 femmine, 8 maschi, età media (deviazione standard): 39 (11) anni, durata media della malattia (deviazione standard): 8,7 (7,5) anni, punteggio medio Expanded Disability Status Scale (EDSS) [minimo, massimo]: 2,6 [0, 6]) e 30 soggetti sani con età e sesso corrispondenti alle persone con SM.

In conclusione abbiamo confrontato i parametri spazio-temporali e cinematici dei 16 soggetti sani calcolati con i sistemi marker e markerless. Abbiamo trovato risultati

comparabili. Inoltre, abbiamo trovato risultati incoraggianti nello studio delle persone con SM. Infatti, la pipeline markerless proposta ha permesso di identificare e quantificare anche nei parametri cinematici i segni di un cammino patologico, comprese le asimmetrie.

## CONCLUSIONI

Abbiamo proposto un approccio completamente markerless per eseguire l'analisi del cammino e lo abbiamo testato (i) confrontandolo con un sistema basato su marker (ii) caratterizzando l'andatura di 30 pazienti con SM e i loro relativi soggetti di controllo. I risultati ottenuti con i due sistemi sono paragonabili, e c'è ancora margine di miglioramento, adottando sistemi di videocamere con maggiore risoluzione temporale. Nell'applicazione clinica il nostro sistema senza marker ha il potenziale per essere una valida alternativa alle tecniche standard basate sui marker.

# Advanced video analysis to detect, measure and monitor motor deficits in people with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Gait analysis is a fundamental tool in rehabilitation. It helps expert physicians to characterize and monitor motion patterns after orthopedic injuries and in neurological diseases, as multiple sclerosis (MS). Furthermore, it can be used to tailor appropriate and specific rehabilitation treatments. Quantitative assessments in addition to visual observations enforce repeatability and objectivity of the analysis. Infrared marker-based motion capture systems (MoCap) due to their high level of precision are the gold standard in modern gait analysis. However, they require many markers to be attached firmly to the body: this is time consuming and results in a cumbersome setup that can affect the naturalness of the motion. They are also expensive and require skilled personnel to apply the markers correctly and to post-process the recorded data, making the overall analysis operator dependent. Thus, the entire process requires many resources in terms of time and personnel. Recently, efforts have been made to study cheaper, faster and simpler approaches to characterize human motion and, consequently, gait analysis. Among possible alternatives, systems based on wearable sensors (such as Inertial Measurements Units, IMU) are less expensive but suffered from the same other issues of the marker-based approaches. In the last decades, advances in markerless pose esti-

mation algorithms, based on computer vision and deep learning, are opening the possibility of adopting efficient methods for extracting motion information starting from common red-green-blue (RGB) video data. This leads to the question of whether deep learning-based approaches can be adopted to analyze human motion in different domains and, specifically, if they can be adopted to perform accurate gait analysis for clinical applications.

Video-based techniques present advantages with respect to marker-based systems. First, markerless video-based approaches are less expensive, not cumbersome and they do not affect the naturalness of the motion. Thus, they can be adopted to study human motion in unconstrained environment. Lastly, these approaches can be fully automated and, hence, not operator dependent. However, there are few studies that quantitatively compare the information extracted with video-based markerless techniques with those retrieved with gold-standard marker-based systems. With this project we aim at filling this gap by comparing both the spatio-temporal parameters and the joint angles changes during the gait cycle, computed from the key points extracted with these two techniques in the 3D space. Furthermore, we are interested in the application of our markerless system to gait analysis in people with MS.

## RESULTS

In this context, the main contribution of this project is summarized as:

1) Implementation of a video-based markerless pipeline for gait analysis. The pipeline takes as input RGB videos (multiple viewpoints of the same scene) and gives as outputs the spatiotemporal and kinematic parameters usually computed in gait analysis.

2) Comparison between marker and markerless systems. We tested the reliability and the stability of the implemented pipeline. To that effect, we acquired the gait of 16 unpaired subjects with both a marker-based system and a multi-view RGB camera system. Then, we computed the spatio-temporal and kinematic gait parameters both with the gold-standard motion-capture system and with our implemented markerless pipeline. Then, we compared the results from the two systems.

3) Gait analysis of people with MS. With our markerless system we acquired and studied the gait of 30 MS participants (22 females, 8 males, mean age (standard deviation): 39 (11) years old, mean disease duration (standard deviation): 8.7 (7.5) years, mean Expanded Disability Status

Scale score (EDSS) [minimum, maximum]: 2.6 [0, 6]) and 30 healthy subjects with age and sex matched with people with MS.

We compared the spatio-temporal and kinematic parameters of the 16 healthy subjects computed with marker-based and our markerless systems. We did not find major differences between them. Furthermore, we found encouraging results in the study of people with MS: the proposed markerless pipeline allowed identifying in the kinematic parameters signs of pathological gait, including walking asymmetries.

## CONCLUSIONS

We proposed a fully marker-less approach to perform gait analysis and tested it (i) in comparison with a gold standard marker-based system and (ii) in the characterization of the gait of 30 MS subjects and their matched controls. The results obtained with the two systems were comparable, although there is still some margin of improvement by adopting video cameras systems with higher temporal resolution. Thus, our markerless system has the potential to be a valid alternative to standard marker-based techniques.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

*The methods proposed and implemented with this project have been applied also in other domains thus we acknowledged the FISM support:*

- Moro M, Casadio M, Mrotek LA, Ranganathan R, Scheidt R, Odone F. On The Precision Of Markerless 3d Semantic Features: An Experimental Study On Violin Playing. 2021 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), 2021, pp. 2733-2737, doi: 10.1109/ICIP42928.2021.9506356.

*Strictly related to this project one paper was submitted and one is in preparation:*

- Moro M, Marchesi G, Hesse F, Odone F, Casadio M. Markerless vs. Marker-Based Gait Analysis: A Proof of Concept Study. *Sensors (Basel)*. 2022 Mar 4;22(5):2011. doi: 10.3390/s22052011
- Markerless Gait Analysis in Multiple Sclerosis Patients. *In preparation for a submission*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 4 months) and the amount of € 30,000

# Soluzioni innovative a basso costo basate su realtà virtuale per la riabilitazione domiciliare dell'arto superiore nella sclerosi multipla



## Massimiliano Pau

*Dipartimento di Ingegneria, Meccanica, Chimica e dei Materiali,  
Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Bruno Leban, Eleonora Cocco, Giancarlo Coghe, Micaela Porta, Federico Arippa,**  
*Unità dell'Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia (Centro 1)*

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Davide Cattaneo, Fabiola Mestanza Mattos, Rita Bertoni, Denise Anastasi, Alberto Marzegan,**  
*Unità IRCCS S. Maria Nascente Fondazione Don Gnocchi, Milano, Italia (Centro 2)*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nel trattamento delle disabilità fisiche associate alla sclerosi multipla (SM), la riabilitazione riveste un ruolo estremamente importante. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato la sua efficacia nel migliorare le funzionalità motorie, le cui alterazioni provocata dalla SM influenzano pesantemente il cammino, l'equilibrio e, in generale, lo svolgimento di attività di vita quotidiana, compromettendo in misura spesso importante l'indipendenza della persona con SM e la sua qualità della vita.

Tuttavia, la maggior parte dei trattamenti riabilitativi vengono effettuati in strutture ospedaliere o centri specializzati, fattore che può limitare significativamente la persistenza degli effetti positivi nel lungo termine, anche a causa dei vincoli imposti dal Servizio Sanitario Nazionale per quanto concerne il numero di sedute prescrivibili. Inoltre, l'esistenza di barriere socio-economiche e geografiche, unitamente alle difficoltà di mobilità intrinseche della persona con SM, possono rendere ancor più difficoltoso il regolare svolgimento di un trattamento riabilitativo.

Studi recenti hanno mostrato che alcuni sistemi a basso costo ideati per l'intrattenimento, possono essere validamente impiegati anche per la riabilitazione di alcuni aspetti della disabilità motoria associata alla SM. Anche se la maggior parte dei risultati si riferisce a miglioramenti nelle abilità di cammino e nel controllo posturale, la letteratura offre anche dati incoraggianti sull'utilizzo di questi sistemi per la riabilitazione degli arti superiori.

Sulla base di tali considerazioni, la presente ricerca ha valutato la fattibilità di impiego di un sistema commerciale di realtà virtuale (RV) quale strumento adatto a trattamenti domiciliari per la riabilitazione degli arti superiori. Obiettivo secondario dello studio è stato quello di progettare e sviluppare uno specifico software RV in grado di superare i principali limiti associati all'utilizzo delle routine commerciali quali scarsa adattabilità alla condizione della persona con SM, difficoltà eccessiva, ecc.

## RISULTATI

I risultati ottenuti dalle valutazioni cliniche e strumentali consentono di stilare un giudizio complessivamente positivo sull'approccio proposto. In particolare, al termine del protocollo riabilitativo, i partecipanti hanno mostrato significativi miglioramenti nella destrezza manuale (come testimoniato dalle performance nel "Box and Block" test e dalla riduzione del tempo necessario a completare il task "Hand to Mouth") nella fluidità del movimento e nella motricità fine (valutata mediante il 9 Hole Peg test), sebbene in quest'ultimo caso solo a vantaggio dell'arto meno affetto. Per contro, tali risultati positivi, non sono sembrati essere immediatamente trasferibili in capacità di svolgimento delle attività di vita quotidiana, in riduzione della fatica percepita o in un incremento della forza di presa. Queste discrepanze potrebbero essere dovute alla dimensione limitata del campione o alla non corretta selezione degli strumenti di valutazione, e dunque in questo senso sono necessari ulteriori approfondimenti.

Un altro importante aspetto da considerare nell'utilizzo di questo tipo di trattamento riabilitativo è rappresentato dal grado di soddisfazione della persona con SM. Durante tutta la campagna sperimentale il livello di motivazione osservato è stato elevato (con una percentuale di drop-off sostanzialmente nulla) e, sebbene la tecnologia fosse sostanzialmente nuova per molti dei partecipanti, essi sono stati in grado di adattarsi facilmente a questa nuova modalità di esercizio. Nell'ultima parte del progetto, le attività sono state concentrate sullo sviluppo di tre giochi progettati ad hoc per persone con SM. I test preliminari effettuati sul nuovo software, hanno permesso di osservare come questi appaiano idonei alla corretta ed appropriata stimolazione dell'esecuzione di tutti quei movimenti che tipicamente sono maggiormente compromessi dalla SM.

## CONCLUSIONI

Complessivamente, i risultati del progetto di ricerca suggeriscono come l'approccio riabilitativo basato sulla RV immersiva possa rappresentare una valida opzione per lo svolgimento di programmi riabilitativi domiciliari focalizzati sul miglioramento della mobilità funzionale degli arti superiori, in particolare per quanto riguarda la destrezza manuale grossolana. La RV può essere proficuamente utilizzata sia quale strumento complementare sia (in caso di necessità) come alternativa alla riabilitazione fisica convenzionale. Infatti, la possibilità di svolgere quotidianamente attività riabilitativa a carattere ludico, senza la necessità di raggiungere centri specializzati e ad un costo contenuto, può promuovere un incremento nella regolarità e nella frequenza con la quale vengono svolti specifici esercizi per la mobilità degli arti superiori e quindi migliorare la persistenza degli effetti positivi associati a questo tipo di trattamenti nel lungo periodo.

# Innovative low-cost solutions for upper limb home-based rehabilitation in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Rehabilitation is extremely important for people with multiple sclerosis (pwMS) as it has been demonstrated effective in the treatment of the motor dysfunctions typical of the disease and which compromise gait, balance and several activities of daily living, thus reducing independence and quality of life of the affected individual. However, most rehabilitative treatments are performed at hospital or in specialized centers, and this is a factor which strongly reduces the persistence of the positive effects in the long-term. Moreover, socio-economic and geographic barriers, together with intrinsic difficulties of pwMS to move frequently when the physical disability is relevant, make it difficult to attend the rehabilitation sessions on a regular basis.

In addition, it should be noted that rehabilitative treatments for pwMS are often focused on lower limbs functional impairments, while upper limbs (UL) dysfunctions seem generally less considered. This is quite surprising, considering that approximately 50% of pwMS complain about issues like reduction of manual dexterity and fine motor abilities as well as movements' slowness.

Recent studies performed in the last decade, demonstrated that the use of low-cost devices originally designed for entertainment purposes, may be effective in improving some aspects of disability of pwMS, especially as regards gait and balance. Few attempts have been reported, so far, as regards UL rehabilitation, but the existing preliminary findings appear encouraging.

On the basis of the above-mentioned considerations, the present research aimed to investigate the feasibility of use

of a commercial Virtual Reality (VR) platform as home-based UL rehabilitation tool. Twelve pwMS were involved in an experimental trial consisting in 12 supervised sessions (of 45 minutes each) of training performed using the Oculus Rift immersive VR system and three games considered suitable for UL rehabilitation. Changes in UL motor function were assessed using clinical test and scales as well as quantitatively with an optical motion capture system by testing the "hand-to-mouth" task.

A secondary purpose of the study was to design and build specific VR software which overcomes the typical drawbacks associated with the use of commercial games (i.e., poor adaptability to the current state of pwMS, excessive complexity, etc.).

## RESULTS

By combining the variations observed through both quantitative and clinical measure, positive indications emerged. In particular, after the rehabilitation protocol, pwMS showed an improved gross manual dexterity (as indicated by higher scores achieved in the Box and Block test and the reduced time necessary to complete the "Hand to Mouth" task), better movement stability and improved fine hand dexterity (assessed by means of the 9HPT) even though, in this latter case, only for the less affected limb. However, such changes did not seem to directly translate into correspondent modifications in terms of self-reported ability to carry out activities of daily living, fatigue, or handgrip strength. Another important aspect regards the enjoyability of the treatment. Through all the experimental campaign, pwMS were constantly motiva-

ted (the drop-off rate was substantially null) and, although the technology was relatively new for most of them, they were able to adapt quite easily to this new way of performing physical training.

As regards the development of new software, specifically designed for the needs of pwMS, three games were created. Their preliminary testing show that they suitably stimulate the type of movements which are usually more compromised by MS.

## CONCLUSIONS

The findings of the present project suggest that a fully immersive VR-based approach may represent a valid option to perform home-based training aimed to improve the UL functions, especially in terms of gross manual dexterity. VR could fruitfully be employed either as complementary or (in case of necessity) alternative tool to the conventional physical rehabilitation programs. Indeed, the possibility to perform daily playful rehabilitation without the need to attend specialized centers and at affordable costs, can promote the regular and frequent performance of exercise targeted to UL movements and thus increase the persistence of the positive effects associated with this kind of treatment in the long-term.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pau M, Leban B, Deidda M, Porta M, Coghe G, Cattaneo D, Cocco E. Use of wrist-worn accelerometers to quantify bilateral upper limb activity and asymmetry under free-living conditions in people with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021, 53:103081. doi: 10.1016/j.msard.2021.103081. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34166981
- Mestanza Mattos F, Bertoni R, Anastasi D., Porta M., Pau M., Cocco E., Cattaneo D. Effects of immersive virtual reality on upper limb function in subjects with multiple sclerosis: a cross-over study (submitted)

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 97.000 €**

Research project founded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 1 year) and the amount of € 97,000

---

# **Verso nuovi trattamenti**

Towards new  
treatments

---

# Strategia di trapianto di cellule staminali neurali ingegnerizzate per promuovere la remielinizzazione e la neuroprotezione nella sclerosi multipla



## Gianvito Martino

Unità di Neuroimmunologia, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS  
**Paola Panina, Luca De Feo, Elena Brambilla**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Nonostante l'efficacia di diverse terapie per la fase recidivante-remittente della SM, una terapia efficace per le forme progressive, caratterizzate da aree di demielinizzazione disseminate e neurodegenerazione, non è ancora disponibile. L'attivazione di cellule staminali neurali sia endogene (in minor misura) che trapiantate, può apportare un beneficio terapeutico attraverso il rilascio di molecole ad attività antiinfiammatoria e neurotrofica, il così detto effetto bystander. Inoltre, anche se meno probabile, le cellule trapiantate potrebbero essere in grado di provvedere alla rigenerazione neuronale. In base a queste proprietà, una terapia basata sul trapianto di precursori neurali rappresenta una nuova strategia terapeutica per la SM, perché i precursori neurali espletano diverse funzioni e potrebbero avere una maggiore efficacia rispetto alle strategie terapeutiche convenzionali basate sull'approccio "una molecola, un effetto".

I risultati di esperimenti svolti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il trapianto intratecale di progenitori neurali (NPC) in topi con encefalite sperimentale autoimmune (ESA), un modello largamente utilizzato di SM, migliora la patologia, tramite il rilascio di molecole anti-infiammatorie e fattori trofici. Con l'obiettivo di massimizzare l'effetto bystander delle cellule trapiantate, i precursori neurali sono stati geneticamente ingegnerizzate con: (i) un vettore lentivirale inducibile che esprime il gene Sox10, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo centrale nel differenziamento degli oligodendrociti, al fine di stimolare la mielinizzazione, e (ii) un vettore lentivirale che esprime fattori con attività bystander in risposta a infiammazione, al fine di indurre una risposta anti-infiammatoria.

### RISULTATI

Al fine di identificare i geni che sono espressi in condizioni infiammatorie dalle NPC, sono state seguite due strategie: (i) analisi del trascrittoma mediante RNA-seq di NPC isolate a diversi tempi (fase acuta e fase cronica) dopo il trapianto in topi con ESA, e (ii) analisi del fenotipo e dell'espressione genica in vitro di NPC stimulate in condizioni infiammatorie, in presenza di citochine Th1/Th17. L'analisi del trascrittoma delle NPC ha permesso di identificare alcuni geni che sono over-espressi in una finestra di tempo ristretta in condizioni infiammatorie.

In contemporanea, abbiamo generato un vettore lentivirale esprimente Sox10, e ne abbiamo validato e dimostrato la capacità di indurre in vitro il differenziamento di NPC in oligodendrociti maturi.

I risultati preliminari dimostrano che l'espressione di Sox10 è sufficiente per indurre e promuovere il differenziamento degli oligodendrociti (come dimostrato dall'espressione dei marcatori O4, GalC) e confermato con analisi citofluorimetriche.

Esperimenti in vivo hanno dimostrato che l'induzione dell'espressione di Sox10 in cellule trapiantate in topi con ESA migliora il decorso clinico della malattia rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati sono confermati anche dall'analisi istopatologica che rivela una riduzione statisticamente significativa della demielinizzazione e del danno assonale, rispetto al controllo. L'analisi in immunofluorescenza indica la presenza delle NPC trapiantate negli spazi meningeali, con solo singole cellule positive per un marcatore di precursori oligodendrocitari (NG2) all'interno del parenchima.

Per quanto riguarda la strategia neuroprotettiva, abbiamo



identificato un gene candidato, il cui promotore è stato clonato a monte il gene del TGFbeta2 murino, al fine di indurre l'espressione solo in presenza di stimoli pro-infiammatori. Questo sistema ad attivazione/inattivazione autonoma, potrebbe rappresentare un potente strumento applicabile alla terapia cellulare per controllare l'attivazione di sistemi di riparo solo in condizioni infiammatorie.

## CONCLUSIONI

In conclusione, la combinazione delle due strategie potrebbe rappresentare (a medio-lungo termine) un nuovo approccio terapeutico, in cui le NPC sono utilizzate come una nuova piattaforma farmacologica per veicolare contemporaneamente mediatori ad azione antinfiammatoria e agenti pro-remielinizzanti.

# Multi-fold transplant strategy of engineered neural stem cells to promote remyelination and neuroprotection in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Approved therapies for MS are effective in the relapsing remitting phase. However, disseminated demyelinated CNS lesions, where classical immune reaction fades away and alternative degenerative mechanisms take place, remain a major unsolved hurdle. Both endogenous, although with limited efficiency, and transplanted stem cells can have a therapeutic function releasing trophic and immunomodulatory signals (bystander effect). Moreover, but with low probability, they can sustain cell replacement. Based on those properties, neural precursor cell (NPC) therapy represents an alternative strategy to face MS because NPCs exploit different functions and could outperform if compared to conventional "one molecule, one effect" approach.

Previous findings from our laboratory have shown that intrathecal transplantation of neural progenitor cells (NPCs) in the EAE mouse model, ameliorates the pathophysiology via releasing of anti-inflammatory and trophic molecules. To maximize the bystander effect of transplanted NPCs and stimulate remyelination, we have genetically engineered, well characterised NPC lines. NPCs have been transduced with: (i) an inducible-lentiviral vector expressing the pro-oligodendrocytic gene Sox10, to induce differentiation onto the oligodendroglial lineage, and stimulate myelination, and (ii) a lentiviral vector expressing bystander cues tuned by inflammatory responsive genes to support anti-inflammatory functions.

## RESULTS

To identify genes that are timely regulated upon inflammatory conditions, we applied two strategies: (i) transcriptome analysis by RNA-seq on NPCs that had been transplanted in EAE mice and then recovered at different time points during the disease (acute vs chronic phase) and, (ii) in vitro time course of NPCs stimulated under Th1/Th17-like inflammatory conditions. Meanwhile, inducible lentiviral vector expressing Sox10 has been generated, and

oligodendrocyte differentiation has been tested in vitro. RNA-seq data from recovered NPCs combined with target specific longitudinal expression profile allowed me to identify few genes, that are in vitro upregulated in a narrow time-window, upon inflammatory conditions. In vitro oligodendrocyte differentiation upon Sox10 transduction was successfully achieved, showing the reliability of the system.

Preliminary data showed that the expression of Sox10 is sufficient to drive and promote oligodendrocyte differentiation, as demonstrated by the expression of specific markers (O4, GalC) and confirmed also by FACS analysis. Preliminary data from a first in vivo experiment have shown that Doxycycline-induced expression of Sox10 in the EAE mouse model ameliorates the clinical outcome as compared to the control group. These data were supported also by histopathological analysis that revealed a statistically significant reduction of demyelination and axonal damage, as compared to control. Immunofluorescence staining indicated the presence of most NPCs in the meningeal space, but few cells had migrated inside the spinal cord parenchyma, which stained positive for the oligodendrocyte precursor cell marker, NG2. Further experiments need to be performed to confirm and support these preliminary data.

Concerning the neuroprotective strategy, a candidate target gene was found, and its promoter was cloned upstream the murine TGFbeta2 gene, in order to activate its expression only upon inflammatory conditions. This self-(in)activating system, if successful, might represent a powerful tool for a cellular therapy approach.

## CONCLUSIONS

The combination of the two strategies might represent a novel future therapeutic strategy (in the medium-long term), in which NPCs could be used as a drug delivery platform simultaneously targeting both neuroinflammation and demyelination.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI), Poster presentation Trieste 2018*
- *Ospedale San Raffaele Scientific Retreat, Poster presentation Baveno 2018*
- *Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI), - Poster presentation*
- *Camogli 2019 Ospedale San Raffaele Scientific Retreat, Poster Presentation Baveno 2019*

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018, per il periodo di due anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 100.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 1 year), and the amount of € 100,000

# Analisi dei trascritti contenuti nelle singole caratteri microvescicole rilasciate dalla microglia ottenuta da cellule pluripotenti umane indotte



**Linda Ottoboni, Roberto Furlan**

*Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

COLLABORATORI/ COLLABORATORS  
**Annamaria Finardi, Alessandra Mandelli**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS  
**Jose Manuel Garcia Manteiga, Marco Morelli**, *Center of OMIC Sciences, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le vescicole extracellulari sono minuscoli oggetti rilasciate da ogni tipo di cellula per mandare segnali alle cellule circostanti. La microglia è un tipo di cellula residente nel cervello e considerata cruciale nel iniziare e mantenere i meccanismi infiammatori importanti nelle fasi progressive di sclerosi multipla. Il progetto originale perciò proponeva di studiare individualmente il contenuto delle vescicole extracellulari rilasciate da microglia umana ottenuta da precursori staminali pluripotenti e stimolata da molecole pro-infiammatorie, nel tentativo di decodificare il messaggio inviato. Ciò avrebbe permesso di capire nuovi meccanismi della progressione e ipotizzare nuovi bersagli terapeutici.

## RISULTATI

Sfortunatamente, due passaggi della proposta originale si sono rivelati tecnicamente impossibili: derivare microglia da precursori staminali pluripotenti e analizzare le vescicole extracellulari individualmente. Abbiamo perciò usato una linea cellulare umana che condivide con la microglia molte caratteristiche e l'abbiamo stimolata con diversi stimoli pro-infiammatori. Abbiamo purificato che vescicole extracellulari rilasciate e le abbiamo analizzate in blocco, tutte insieme. Abbiamo scoperto che i diversi stimoli pro-infiammatori hanno prodotto un contenuto differente nelle vescicole extracellulari, confermando che le cellule inviano messaggi differenti a seconda degli stimoli ricevuti. Attraverso analisi bioinformatiche abbiamo identificato centinaia di molecole contenute nelle vescicole extracel-

lulari e abbiamo prodotto un complesso database di potenziali segnali inviati.

## CONCLUSIONI

Le vescicole extracellulari rappresentano un modo di comunicare delle cellule di recente scoperta ancorché difficile tecnicamente da indagare. Il nostro progetto pilota ha consentito la messa a punto di tecniche robuste e riproducibili per questa indagine e ha prodotto già un database di segnali inviati da cellule simili a quelle potenzialmente coinvolte nella progressione della sclerosi multipla. Le ulteriori analisi in corso consentiranno di formulare perciò originali ipotesi di meccanismi di progressione di malattia, da un lato, e di estendere queste indagini a nuove linee o sottotipi cellulari importanti nella neuroinfiammazione.

# Single extra-micro-cellular vesicle sequencing analysis from human induced pluripotent stem cell derived microglia

## INTRODUCTION AND AIMS

Extracellular vesicles are very small objects released by every cell type to deliver signals to neighboring cells. Microglia is considered a crucial cell type igniting and maintaining inflammatory mechanisms especially during progressive phases of multiple sclerosis. Thus, the original proposal wanted to produce human microglia from pluripotent stem cells, stimulate them with inflammatory stimuli, and study the individual content of the vesicles they release, trying to decode the message they deliver. The final aim was to identify new progression mechanisms and possibly new therapeutic targets.

## RESULTS

Unfortunately, two steps of these project revealed to be technically impossible: reliably derive microglia from pluripotent stem cells and assess the content of extracellular vesicles individually. We therefore used a human cell line that has several features similar to microglia and stimulated it with different pro-inflammatory stimuli. We harvested released extracellular vesicles and we analyzed their content

in bulk, all together. We found that the different stimuli induce different contents in extracellular vesicles, confirming that cells deliver different messages according to the different stimuli received. Through bioinformatic analyses, we identified hundreds of different molecules delivered by extracellular vesicles and we produced a complex database of the potential signals.

## CONCLUSIONS

Extracellular vesicles represent a relatively new way of intercellular communication, although technically difficult to investigate. Our pilot project has allowed to set robust and reproducible techniques for this investigation, and has already yielded a large database of signals delivered by cells similar to those potentially involved in multiple sclerosis progression. Further analyses currently ongoing will therefore allow to formulate novel hypotheses on disease progression, on one side, and to extend these investigations to new cell lines or cell subtypes relevant in neuroinflammation.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- XXIX Meeting of the Italian Neuroimmunology Association – AINI, Verona, 16-19 September 2021

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 1 anno (prorogato di 2 anni) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 1 years (extended by 2 years) and the amount of € 30,000

# Attivazione del recettore Met come strumento terapeutico nella sclerosi multipla: un nuovo meccanismo di neuroprotezione che coinvolge il sistema glutammatergico



## Paolo Comoglio

IFOM, Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milano, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Claudia Desole**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Tiziana Crepaldi, Simona Gallo**, Dipartimento di Oncologia, Università degli Studi di Torino, Torino; Istituto Oncologico Candiolo, FPO-IRCCS, Candiolo, Italia

**Antonio Bertolotto**, Istituto di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi, Orbassano (TO), Italia

**Francesca Montarolo**, Istituto di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi, Orbassano (TO); Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università degli Studi di Torino, Torino, Italia

**Denis Vivien**, INSERM U1237, Université de Caen, Caen, Francia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC) ed è caratterizzata dalla presenza di cellule T auto-reattive, infiammazione, perdita di mielina e morte dei neuroni. Il fattore di crescita epatocitario (HGF), ligando del recettore Met e citochina con funzioni anti-infiammatorie, è stato associato a un miglioramento clinico del modello animale di SM (ESA). Sfortunatamente, HGF non può essere facilmente sviluppato come farmaco biologico, perché contiene dei siti di legame a bassa affinità ma alta avidità per l'eparina che lo sequestrano a livello dei proteoglicani della matrice extracellulare. Perciò, le molecole che lo mimano sono di interesse clinico. Tra le molecole terapeutiche maggiormente utilizzate in campo clinico emergono gli anticorpi monoclonali, che possono essere ingegnerizzati e prodotti in tempi brevi e con tecniche ormai assodate, e mostrano una buona biodistribuzione nel circolo sanguigno.

In questo progetto, l'obiettivo principale è stato quello di ingegnerizzare un anticorpo monoclonale attivante il recettore Met (RDO24) come sostituto terapeutico di HGF per stimolare le funzioni anti-infiammatorie nella SM. Tra i meccanismi patologici che svolgono un ruolo importan-

te nel danno neuronale nella SM emerge l'eccitotossicità, un processo tossico derivante dall'eccessiva produzione di glutammato e dall'iperattivazione dei recettori glutammatergici, tra cui quelli ionotropici NMDAR. In considerazione dell'attività neuroprotettiva mediata da Met, da un punto di vista molecolare, lo studio ha avuto anche l'obiettivo di identificare una relazione molecolare e funzionale tra i recettori Met e NMDAR.

## RISULTATI

Grazie al finanziamento ottenuto il gruppo di ricerca ha raggiunto il principale obiettivo del progetto, ossia ha ingegnerizzato un anticorpo ricombinante (RDO24) che lega con alta affinità il dominio extracellulare del recettore Met. Il legame avviene in un dominio specifico (PSI) differente da quello del ligando naturale HGF (Sema). Una volta che RDO24 lega Met, ne induce la dimerizzazione, la transfosforilazione sul dominio tirosin-chinasico e l'attivazione della trasduzione del segnale. In maniera significativa, RDO24 mima i meccanismi di azione del ligando naturale HGF stimolando le stesse risposte biologiche, tra cui la migrazione cellulare e la riparazione delle ferite. La somministrazione in vivo di RDO24 nel modello speri-

mentale murino di sclerosi multipla ESA ritarda lo sviluppo della patologia, mitiga i sintomi precoci e riduce gli infiltrati infiammatori, confermando il ruolo anti-infiammatorio di Met attivato. Inoltre, abbiamo dimostrato in vitro, in colture primarie di neuroni corticali, che l'attivazione di Met, attraverso il trattamento con il ligando naturale HGF o l'anticorpo ingegnerizzato RDO24, riduce il flusso di calcio indotto dall'iperattivazione di NMDAR tramite il suo ligando NMDA, e protegge dalla morte indotta dall'ecitotossicità. Tra i meccanismi molecolari alla base della neuroprotezione mediata da Met abbiamo dimostrato, con l'ausilio di un saggio di prossimità molecolare e l'analisi di co-immunoprecipitazione, la presenza di un'interazione fisica tra il recettore Met e il recettore del glutammato NMDAR.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nello svolgimento del progetto suggeriscono che l'attivazione di Met può essere una strategia da sviluppare per mitigare la SM. L'uso di una terapia basata su un anticorpo monoclonale si è dimostrata promettente in clinica e la versatilità con cui queste molecole possono essere modificate ne aumenta il potenziale terapeutico. Il gruppo di ricerca ha adesso l'obiettivo di migliorare l'efficacia dell'anticorpo ingegnerizzato per renderlo maggiormente funzionale nell'ambito della sua biodistribuzione nel SNC al fine di promuovere un suo futuro utilizzo nell'uomo. La potenziale implicazione dell'interazione di Met con il sistema glutammatergico è un importante punto di partenza per migliorare uno strumento terapeutico direzionato a Met sfruttabile nella SM.

# Activation of the Met receptor as therapeutic tool in MS: a new neuroprotective mechanism involving the glutamatergic system

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS). It is characterized by auto-reactive T cells, inflammation, loss of myelin, and neuronal death. Hepatocyte growth factor (HGF), the ligand of Met receptor and cytokine with anti-inflammatory functions, has been associated with an improvement of the clinical outcome in MS animal model (EAE). Unfortunately, HGF cannot be easily developed as biological drug, since it contains low affinity-high avidity heparin-binding sites which sequester it on proteoglycans in the extracellular matrix. Thus, HGF mimicking molecules are of clinical interest. Among the increasingly used therapeutic molecules, the monoclonal antibodies emerge. They can be engineered and produced in short times with established techniques and show an effective bloodstream biodistribution. In this project, the main goal was engineering a Met receptor activating monoclonal antibody (RDO24) as therapeutic substitute of HGF to stimulate anti-inflammatory function in MS. Among the pathological mechanisms which have an important role in MS neuronal damage, the excitotoxicity comes to light. It is a toxic process due to excessive glutamate production and overactivation of glutamatergic receptors, such as the ionotropic NMDAR. In consideration of the Met-mediated neuroprotective activity, from a molecular point of view, the study had also the objective to identify a molecular and functional relation between Met and NMDAR receptors.

## RESULTS

Thanks to the obtained grant the research group reached the main goal of the project by engineering a recombinant antibody (RDO24) which binds with high affinity the extracellular domain of Met receptor. The binding occurs on a specific domain (PSI) different from that of the natural ligand HGF (Sema). Once RDO24 binds Met, it induces receptor dimerization, tyrosine kinase transphosphorylation, and activation of signal transduction. RDO24, significantly, mimics the mechanisms of action of the natural HGF ligand stimulating the same biological responses, among which cell migration and wound repair. The in vivo administration of RDO24 in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of MS, delays the pathological development, mitigates the precocious symptoms, and reduces the inflammatory infiltrates. These results confirm the anti-inflammatory role of activated Met. Furthermore, we demonstrated in vitro, in primary cultures of cortical neurons, that Met activation, by the treatment with the natural HGF ligand or the engineered RDO24 antibody, reduces the calcium flux induced by the NMDAR overactivation through its NMDA ligand and protects from excitotoxicity-induced death. Among the molecular mechanisms of Met-mediated neuroprotection we demonstrated, by proximity ligation assay and co-immunoprecipitation analysis, the presence of a physical interaction between the Met receptor and the glutamate receptor, NMDAR.

## CONCLUSIONS

The results, obtained during the project, suggest that Met activation can be a strategy to be developed for MS mitigation. The use of monoclonal antibody-based therapy proved to be promising in clinic and the versatility with which these molecules can be modified increases their therapeutic potential. The research group now has the

goal to improve the efficacy of the engineered antibody to make it more functional in CNS biodistribution in order to promote its future use in humans. The potential implication of Met interaction with the glutamatergic system is an important starting point to improve a Met-targeted therapeutic tool exploitable in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Desole C, Gallo S, Vitacolonna A, Vigna E, Basilico C, Montarolo F, Zuppini F, Casanova E, Miggiano R, Ferraris DM, Bertolotto A, Comoglio PM, Crepaldi T. Engineering, characterization, and biological evaluation of an antibody targeting the HGF receptor. *Front Immunol.* 2021; 12: 775151
- Desole C, Gallo S, Vitacolonna A, Montarolo F, Bertolotto A, Vivien D, Comoglio P, Crepaldi T. HGF and MET: from brain development to neurological disorders. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 683609
- Garnier E, Levard D, Ali C, Buendia I, Hommet Y, Gauberti M, Crepaldi T, Comoglio P, Rubio M, Vivien D, Docagne F, Martinez de Lizarrondo S. Factor XII protects neurons from apoptosis by epidermal and hepatocyte growth factor receptor-dependent mechanisms. *J Thromb Haemost.* 2021; 19: 2235-2247
- Hedou E, Douceau S, Chevilly A, Varangot A, Thiebaut AM, Triniac H, Bardou I, Ali C, Maillason M, Crepaldi T, Comoglio P, Lemarchand E, Agin V, Roussel BD, Vivien D. Two-chains tissue plasminogen activator unifies Met and NMDA receptor signalling to control neuronal survival. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 13483

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 160.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 160,000



# Liposomi “janus-faced” come strumenti terapeutici in grado di mediare un fenotipo T soppressorio nella sclerosi multipla



## Francesco Ria

*Dipartimento di Medicina e Chirurgia Traslazionali, Sezione di Patologia Generale, Università Cattolica del S. Cuore, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Gabriele Di Sante, Maria Tredicine, Renato Falcicchia, Mariagrazia Valentini, Chiara Camponeschi, Maria De Carluccio, Camilla Moliterni**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Maurizio Fraziano, Noemi Poerio, Federica De Santis**, *Dipartimento di Biologia, Università “Tor Vergata” Roma, Italia*

**Massimiliano Mirabella, Matteo Lucchini**, *Dipartimento di Neuroscienze, Università Cattolica del S. Cuore, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia*

**Assunta Bianco**, *UOC di Neurologia, UOS day hospital di Sclerosi Multipla, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia*

**Valeria De Arcangelis**, *UOC di Neurologia, laboratorio di Neuroscienze, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia mediata dalle risposte delle cellule T ad antigeni del sistema nervoso centrale (SNC) come la proteina basica della mielina (MBP).

I farmaci attualmente impiegati contro la SM possono comportare alcuni importanti effetti collaterali, la maggior parte dei quali legati alla loro incapacità di bloccare in modo selettivo la risposta immunitaria, e questo può causare la riattivazione di patogeni latenti. È stato dimostrato in modelli sperimentali di diabete che l'induzione di una risposta antiinfiammatoria (Treg) specifica verso un singolo peptide è in grado di produrre effetti che si diffondono all'intera risposta autoimmune, provocando un miglioramento della malattia. Avevamo inoltre osservato che la somministrazione di peptidi della mielina nei topi SJL insieme a liposomi (nanoparticelle costituite da una doppia parete di acidi grassi che mimano la parete cellulare e altre vescicole di trasporto) induceva un miglioramento dell'encefalite sperimentale autoimmune, un modello sperimentale SM.

L'obiettivo del nostro progetto era di valutare la capacità di una nuova classe di liposomi come agenti immunomodulatori in grado di promuovere la differenziazione delle cellule T antigene-specifiche verso un fenotipo Treg. Un

vantaggio “farmacologico” dei liposomi rispetto ad altri sistemi consiste nella loro capacità di trasportare antigeni complessi, come, nel caso della SM, tutta la MBP, rappresentando di fatto una novità interessante dal punto di vista immuno-tecnologico.

Il progetto ha quindi come obiettivi: la valutazione della capacità dei liposomi di modulare la risposta antigene-mediata e di modificare il repertorio dei linfociti T nei pazienti con SM; l'analisi della modulazione del fenotipo regolatorio in presenza di liposomi in pazienti con SM; test del liquido cerebrospinale (CSF) al fine di analizzare le molecole in grado di modulare l'equilibrio TH17/Treg in presenza di liposomi.

Nel corso del progetto abbiamo valutato la capacità immunoregolatoria di due classi diverse di liposomi: Liposomi simmetrici di fosfatidilserina (PSPS-liposomi) e asimmetrici, con fosfatidilserina e acido fosfatidico (PSPA-liposomi). Abbiamo quindi saggiato le capacità immunomodulatorie di entrambi i tipi di liposomi in parallelo su due differenti cellule immuni, entrambe coinvolte nella patogenesi della SM: monociti e linfociti. Obiettivo complessivo è stato accumulare prove precliniche necessarie per eventualmente proporre l'uso dei liposomi come adiuvanti nelle terapie immunomodulatorie della SM.

## RISULTATI

I risultati ottenuti dimostrano che i liposomi di tipo PPSPS erano in grado di entrare efficacemente sia nei macrofagi di tipo M1 (pro-infiammatori) che M2 (antiinfiammatori); i liposomi PSPA venivano internalizzati efficientemente dagli M2. Conseguentemente, i liposomi PSPA non erano in grado di diminuire l'attitudine pro-infiammatoria né di promuovere l'attività antiinfiammatoria delle cellule T. Al contrario, i liposomi di tipo PPSPS espandevano i Treg e riducevano i Th1 e i Th17 (entrambi pro-infiammatori) candidandosi quindi a potenziali farmaci immunomodulatori. La capacità di up-regolare la risposta Treg si associava alla presenza di una maggiore componente M2 nel sangue periferico, mentre quella di down modulare Th17 si associava a una più alta presenza di M1. Infine, l'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti dimostrava che la down-modulazione delle risposte Th17 avviene nei pazienti con lesioni attive nel SNC, mentre la down-regolazione dei Th1 avveniva in pazienti con una durata di malattia maggiore di 3 mesi. Tutti questi effetti erano anche presenti in presenza di stimolo antigenico, confermando ulteriormente la possibilità di utilizzare i liposomi PPSPS

come agenti immunomodulatori in corso di SM, con effetti che si modificavano in funzione della fase di malattia del paziente.

## CONCLUSIONI

Confermando quanto ottenuto nei modelli sperimentali da noi e da altri, i dati riportati supportano la possibilità di utilizzare i liposomi PPSPS come agenti immunomodulatori in corso di SM. Una caratteristica particolare di questo sistema è che gli effetti della somministrazione si modificano in funzione della fase di malattia del paziente, in un range che va dalla limitazione della attività delle cellule pro-infiammatorie Th17 in fase acuta di malattia, alla limitazione della attività delle Th1 in fase tardiva, alla promozione delle cellule Treg.

Tuttavia questi dati aumentano anche le nostre conoscenze sulla patogenesi della SM nell'uomo, indicando che i primi mesi di malattia sono caratterizzati da una forte espansione dei macrofagi di tipo M1 che viene meno nel corso della malattia. Inoltre, gli episodi acuti di malattia riflettono una temporanea diminuzione dei macrofagi di tipo M2.

# Janus-faced liposomes as therapeutic tools to drive T suppressor phenotype in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is mediated by the activity of T cells towards antigens of the central nervous system (CNS), such as (e.g.) the myelin basic protein (MBP). All drugs currently used in the therapy of MS are limited by severe side effects, mainly due to their inability to block the self-reactive response selectively, thereby inducing the re-activation of latent infectious agents. In experimental models of type 1 diabetes (another autoimmune disease as MS) it was observed that the induction of anti-inflammatory response (Treg), specific for a self-antigen, produces a beneficial spread of the anti-inflammatory effects to the whole autoimmune response, resulting in amelioration of the disease. In addition, we had previously observed that the administration of a myelin peptide in tandem with liposomes (nanoparticles constituted by a double layer of fatty acids that mimic the cell wall and other extracellular transport vesicles) resulted in the amelioration of the experimental model of MS, the experimental autoimmune encephalomyelitis. The main aim of our project was therefore to evaluate the ability of a new class of liposomes to act as immunomodulatory agents, promoting the differentiation of (myelin-specific) T cells towards an anti-inflammatory phenotype (Treg) dampening the pro-inflam-

matory phenotypes Th1 and Th17 in human cells from MS patients. One relevant advantage of the pharmacology of liposomes is that they can carry large molecules, such as the entire MBP, thus circumventing the limits of other peptide specific techniques such as administration of HLA/peptide complexes that limits their usage to patients selected according to their HLA haplotype. The aims of the project were as follow: Evaluation of the ability of liposomes to modulate the antigen-driven response and to skew the repertoire of T lymphocytes in Multiple Sclerosis (MS) patients; Analysis of the modulation of regulatory phenotype in presence of liposomes in MS patients; Assay of the cerebrospinal fluid (CSF) to analyze the molecules able to modulate TH17/Treg balance in presence of liposomes.

During the project, we evaluated the immunoregulatory activity of two distinct classes of liposomes: symmetric liposomes, in which both layers of the wall are made of phosphatidylserine (PPSPS-liposomes) and asymmetric liposomes in which the inner layer was constituted by phosphatidic acid (PSPA-liposomes). In fact, independent observations from our and others' laboratories had reported that both types of liposomes had immunomodulatory properties. It was therefore of interest to compare both types

of liposomes side by side on monocytes and lymphocytes from MS patients.

Overall, the general aim of this project has been to collect preclinical observations to propose the usage of liposomes as adjuvant in immunomodulatory therapies of MS.

## RESULTS

We evaluated in vitro the potential immunomodulatory activity of nanoparticles – liposomes, either alone or in the presence of the myelin basic protein (MBP) peptide (residues 85–99) (PSPS-MBP and PSPA-MBP). Results showed that PSPS are equally and efficiently internalized by pro- and anti-inflammatory monocytes (M1 and M2 respectively), while PSPA were internalized better by M2 than M1. PSPS liposomes were able to inhibit the secretion of innate pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . PSPA liposomes were unable to dampen pro-inflammatory T cells and to promote immune-regulatory phenotype (Treg), while PSPS liposomes expanded Tregs, reducing Th1 and Th17 cells. PSPS liposomes were more effective in decreasing Th1 (but not Th17) cells in MS patients with a disease duration > 3 months. On the other hand, down-modulation of Th17 cells was evident in MS patients with active, Gadolinium enhancing lesions at the

RMN and in MS patients with a high basal expression of M1-associated markers in the monocytes. Ability of PSPS liposomes to up-regulate Treg cells was more pronounced in MS patients with high basal expression of M2 markers. The same findings were observed for the modulation of MBP-driven Th1/Th17/Treg responses.

## CONCLUSIONS

Confirming the observations obtained in experimental models, our data support a role for PSPS liposomes and PSPS-MBP liposomes as new therapeutic strategies to dampen the pro-inflammatory immune responses and to promote its regulatory branch. A peculiar characteristic of this new tool is that effects of its administration change depending on the disease stage in the patients, ranging from dampening the pro-inflammatory Th17 cells during acute presentation of MS, to limiting Th1 responses in the late disease, to Treg promotion.

From the point of view of the biology of MS, these observations suggest that early MS associate to a hard-wired pro-Th1 phenotype of M1 that is lost later, during disease course. Acute inflammatory events reflect a temporary decrease of M2 phenotype that however is amenable to restauration by treatment with PSPS liposomes.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Ria F, Tredicine M, Poerio N, Lucchini M, Bianco A., De Santis F, Valentini M, De Arcangelis V, Camponeschi C, Nociti V, Mirabella M, Fraziano M, Di Sante G. Liposome-based nanoparticles modulate Macrophages and T cells regulatory and effector phenotypes in multiple sclerosis patients. In Preparation
- Tredicine M, Camponeschi C, Pirolli D, Lucchini M, Valentini M, Geloso MC, Mirabella M, Fidaleo M, Righino B, Moliterni C, Giorda E., Rende M, De Rosa MC, Foti M, Constantin G, Ria F, Di Sante G. A TLR/CD44 axis regulates T cell trafficking in experimental and human Multiple Sclerosis. *iScience*, 2022, 25(2), 103763 10.1016/j.isci.2022.103763
- Poerio N, Riva C, Olimpieri T, Rossi M, Lorè NI, De Santis F, Henrici De Angelis L, Ciciriello F, D'Andrea MM, Lucidi V, Cirillo DM, Fraziano M. Combined Host- and Pathogen-Directed Therapy for the Control of *Mycobacterium abscessus* Infection. *Microbiol Spectr*. 2022 Jan 26:e0254621. doi: 10.1128/spectrum.02546-21
- Di Sante G, Gremese E, Tolusso B, Cattani P, Di Mario C, Marchetti S, Alivernini S, Tredicine M, Petricca L, Palucci I, Camponeschi C, Aragon V, Gambotto A, Ria F, Ferraccioli GF. *Haemophilus Parasuis* (*Glaesserella parasuis*) as a driver of molecular mimicry and inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in medicine*, <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.671018>
- Michetti F, Di Sante G, Clementi ME, Sampaolese B, Casalbone P, Volonté C, Romano Spica V, Parnigotto PP, Di Liddo R, Amadio S, Ria F. Growing role of S100B protein as a putative therapeutic target for neurological- and nonneurological-disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021 May 7;127:446-458. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.04.035
- De Maria Marchiano R, Di Sante G, Piro G, Carbone C, Tortora G, Boldrini L, Pietragalla A, Daniele G, Tredicine M, Cesario A, Valentini V, Gallo D, Babini G, D'Oria M, Scambia G. Translational Research in the Era of Precision Medicine: Where We Are and Where We Will Go. *J Pers Med*. 2021 Mar 18;11(3):216. doi: 10.3390/jpm11030216
- Di Sante G, Tredicine M, Rolla S, Di Pino A, Ria F. Past and Future of the Molecular Characterization of the T Cell Repertoire: Some Highlights of Eli Sercarz's Contributions. *Crit Rev Immunol*. 2020;40(3):249-253. doi: 10.1615/CritRevImm.2020034613
- Marchese E, Valentini M, Di Sante G, Cesari E, Adinolfi A, Corvino V, Ria F, Sette C, Geloso MC. Alternative splicing of neurexins 1-3 is modulated by neuroinflammation in the prefrontal cortex of a murine model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2021 Jan;335:113497. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113497
- Di Sante G, Amadio S, Sampaolese B, Clementi ME, Valentini M, Volonté C, Casalbone P, Ria F, Michetti F. The S100B Inhibitor Pentamidine Ameliorates Clinical Score and Neuropathology of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Mouse Model. *Cells*. 2020 Mar 18;9(3):748. doi: 10.3390/cells9030748
- Poerio N, De Santis F, Rossi A, Ranucci S, De Fino I, Henriquez A, D'Andrea MM, Ciciriello F, Lucidi V, Nisini R, Bragonzi A, Fraziano M. Liposomes Loaded With Phosphatidylinositol 5-Phosphate Improve the Antimicrobial Response to *Pseudomonas aeruginosa* in Impaired Macrophages From Cystic Fibrosis Patients and Limit Airway Inflammatory Response. *Front Immunol*. 2020 Oct 2;11:532225. doi: 10.3389/fimmu.2020.532225
- De Santis F, Poerio N, Gismondi A, Nanni V, Di Marco G, Nisini R, Thaller MC, Canini A, Fraziano M. Hydroalcoholic extract from *Origanum vulgare* induces a combined anti-mycobacterial and anti-inflammatory response in innate immune cells. *PLoS One*. 2019 Mar 4;14(3):e0213150. doi: 10.1371/journal.pone.0213150
- Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2018 Feb 5;9:155. doi: 10.3389/fimmu.2018.00155

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 3 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 300.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 3 years (extended by 1 year) and the amount of € 300,000

# Vescicole extracellulari di origine mieloide nel sangue: una finestra sulle disfunzioni sinaptiche e un possibile bersaglio per una nuova terapia epigenetica nella SM



## Claudia Verderio

Istituto CNR di Neuroscienze, sede di Milano, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Marta Lombardi, Giulia D'Arrigo, Martina Gabrielli**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Brigit de Jong, Marijn Huiskamp, Charlotte E. Teunissen, VU Medical Center, Amsterdam, Netherlands**

**Chiara Fenoglio, Elio Scarpini, Fondazione Ca' Granda, Policlinico di Milano, Milano, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è stata a lungo considerata una malattia infiammatoria della sostanza bianca, associata a danno assonale secondario alla perdita di mielina. Tuttavia, studi recenti mostrano che la disfunzione sinaptica sia un meccanismo precoce nella SM. È stato osservato che il danno assonale e la perdita di neuroni possano avvenire indipendentemente dalle lesioni della mielina e possano essere alla base della disabilità neurologica e dei deficit cognitivi dei pazienti con SM. Nonostante la SM inizi come un disturbo sinaptico, i meccanismi molecolari alla base delle alterazioni sinaptiche e dell'alterata connettività nella malattia non sono ancora chiari.

Abbiamo recentemente associato l'attivazione della microglia, le cellule immunitarie del cervello, alla disfunzione sinaptica nella SM. Abbiamo osservato che la produzione di vescicole extracellulari (VE) microgliali è aumentata nei pazienti con SM e che le VE microgliali alterano la trasmissione sinaptica e ne compromettono la stabilità. Le VE sono state recentemente riconosciute come importanti mediatori della comunicazione cellula-cellula nel sistema nervoso, in grado di trasferire tra cellule una varietà di biomolecole, come lipidi, proteine e materiale genetico. Tra le molecole contenute nelle VE che possono influenzare la funzione sinaptica, sono presenti piccole sequenze di RNA non codificanti (miRNA) che controllano l'espressione di geni sinaptici (Prada et al., 2018). Silenziando proteine post-sinaptiche, questi miRNA compromettono la sta-

bilità e la funzione delle sinapsi e possono potenzialmente causare difetti nella plasticità sinaptica e disfunzioni cognitive dei pazienti con SM.

Il primo obiettivo di questo progetto è stato chiarire gli effetti delle VE secrete da microglia infiammata sull'eccitabilità dei neuroni e su una forma di plasticità sinaptica a lungo termine (LTP) che si ritiene essere alla base dell'apprendimento e della memoria.

Il secondo obiettivo è stato esplorare se il contenuto vescicolare di miRNA che controllano l'espressione di geni sinaptici nell'uomo potesse riflettere i sintomi cognitivi nei pazienti con SM, migliorando la stratificazione dei pazienti con SM e/o la loro prognosi.

## RISULTATI

Abbiamo valutato l'ipotesi che i miRNA contenuti nelle VE prodotte da microglia infiammata potessero causare alterazioni sinaptiche e alle connessioni neuronali a livello del circuito entorinale-ippocampale del topo, un sito chiave per la formazione della memoria e per le funzioni cognitive (scopo 1). Abbiamo misurato il potenziamento a lungo termine (LTP), una forma di plasticità sinaptica nella corteccia entorinale (EC) e nel giro dentato (DG) di topi iniettati nell'EC con VE prodotte da microglia infiammata (i-VE) o cellule non stimolate (ctr-VE). Abbiamo osservato che LTP è inibito nell'EC di topi iniettati con i-VE sia 1 ora che 24 ore dopo l'iniezione, mentre si manifesta nell'EC di topi iniettati con ctr-EV. LTP non è stato inibito nel DG 1

o 24 ore dopo l'iniezione di i-VE nella EC, rivelando un'alterazione locale della plasticità sinaptica.

Rispetto al secondo obiettivo, avevamo pianificato di misurare il contenuto di 4 miRNA nelle VE circolanti nel sangue dei pazienti con SM. Questi miRNA erano stati selezionati perché sovra-espressi nelle VE rilasciate da microglia infiammata di ratto e trasferiti ai neuroni e perché silenziano proteine fondamentali per la stabilità sinaptica sia nei roditori che nell'uomo (Prada I et al., *Acta Neuropathol* 2018). Tuttavia, esistono tanti altri miRNA che regolano l'espressione di geni sinaptici nell'uomo, che non sono stati presi in considerazione in fase di presentazione del progetto. Pertanto, per aumentare la possibilità di identificare dei miRNA vescicolari che riflettano/predicano i sintomi cognitivi nei pazienti con SM, abbiamo inizialmente esteso a 14, numero massimo di miRNA analizzabili tramite il nostro approccio di analisi qPCR, i miRNA con bersagli sinaptici verificati nell'uomo. Una volta selezionati, i miRNA candidati sono stati misurati sia nelle VE totali che mieloidi isolate dal plasma congelato di due piccole coorti di pazienti con SM con o senza deficit cognitivi, reclutati presso l'IRCCS Fondazione Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e presso il VU Medical Center di Amsterdam. Le funzioni cognitive sono state valutate tramite una versione breve della Rao Battery nella coorte italiana e tramite una batteria di 7 test neuropsicologici, che misurano i domini cognitivi più compromessi nella SM, nella coorte olandese. La classificazione dei disturbi cognitivi è stata corretta per età, sesso e istruzione. Abbiamo osservato che due miRNA, arricchiti nelle cellule mieloidi, ov-

vero miR-150-5p e let7b-5p, sono diversamente espressi nelle VE mieloidi dei pazienti con deficit cognitivi rispetto a pazienti cognitivamente preservati. In particolare, le VE mieloidi di pazienti con deficit cognitivi sono caratterizzate da livelli più elevati di miR-150-5p e livelli più bassi di let-7b-5p rispetto ai pazienti senza deficit.

## CONCLUSIONI

Dimostrando che le VE prodotte dalla microglia infiammata (i-VE) causano alterazioni della plasticità sinaptica in vivo, i nostri dati hanno pienamente confermato l'ipotesi che le i-EV contribuiscano alla disfunzione cognitiva, rivelando un possibile meccanismo alla base delle alterazioni cognitive nei pazienti con SM.

I nostri dati di trascrittomica indicano che la quantificazione di let-7b-5p e miR-150-5p nelle VE mieloidi possano rappresentare uno strumento utile per misurare le disfunzioni cognitive nella SM, migliorando il monitoraggio del decorso della malattia nel paziente. Tuttavia, per consolidare questi risultati saranno necessarie ulteriori analisi in coorti più ampie di pazienti con e senza deficit cognitivi.

Prevediamo che l'identificazione delle proteine sinaptiche e/o presenti nelle cellule mieloidi controllate da miR-150-5p e let-7b-5p nel tessuto cerebrale di pazienti con deficit cognitivo potrà anche aprire la strada a nuove terapie indirizzate al trattamento dei disturbi cognitivi. Infatti, mentre sono disponibili terapie appropriate per prevenire le ricadute indotte dalle cellule immunitarie, mancano ancora terapie efficaci per prevenire i processi neurodegenerativi e le disabilità cognitive.

# Circulating extracellular vesicles derived by myeloid cells: a window on synaptic dysfunction and a target for novel epigenetic intervention in MS

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) has been long considered an inflammatory disorder of the white matter, associated to axon damage secondary to demyelination. However, recent evidence shows that synaptic dysfunction is an early mechanism in MS. Axonal damage and neuron loss may be independent of myelin lesion and may be responsible for the neurological disability and cognitive deficits of MS patients. Despite MS begins as a synaptic disorder we still lack a full understanding of the molecular mechanisms underlying synaptic changes and altered connectivity in the disease.

Our recent work provided a possible link between activation of microglia, the immune cells of the brain, and synaptic dysfunction in MS. We found that production of

extracellular vesicles (EVs) from inflammatory microglia is elevated in MS patients and that microglia-derived EVs alter synaptic transmission and impair synaptic stability. EVs recently entered the scene of neuroscience as important mediators of cell-to-cell communication, which transfer a variety of biomolecules, such as lipids, proteins and genetic materials between cells. Among EV cargo which may influence synaptic function, our recent data point to few small non-coding RNAs (miRNAs) which have validated synaptic targets (Prada et al., 2018). By silencing post-synaptic proteins these miRNAs impair synapse stability and function, and may therefore be responsible for defects in synaptic plasticity and cognitive dysfunction in MS patients.



The first aim of this project was to elucidate the effects of EVs secreted by inflammatory microglia on neuron excitability and a form of synaptic plasticity (LTP) which is thought to underlie learning and memory in the brain. The second aim was to explore whether the content of miRNAs targeting synaptic genes in EVs may reflect cognitive symptoms in MS patients, improving stratification and prognosis of persons with MS.

## RESULTS

We tested our hypothesis that the miRNA cargo of EVs produced by inflammatory microglia may cause synaptic changes and alter connectivity in the mouse entorhinal-hippocampal circuit, a key site for memory formation and cognition (aim 1). We measured long term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity in the entorhinal cortex (EC) and the dentate gyrus (DG) of mice injected into the EC with EVs produced from inflammatory microglia (i-EVs) or unstimulated cells (ctr-EVs). We found that LTP was blocked in the EC of mice injected with i-EVs both 1h and 24h after the injection, while LTP was reliably elicited in the EC of mice injected with ctr-EVs. LTP was not blocked in the DG 1h or 24h after i-EVs injection, revealing that i-EVs impair synaptic plasticity locally.

With respect to aim 2, we planned to measure the content of 4 miRNAs in EVs circulating in the blood of MS patients. These miRNAs were selected because they are upregulated in i-EVs released from rat primary microglia, are transferred to neurons, have validated synaptic targets both in rodents and in humans and impair synaptic stability (Prada I et al., *Acta Neuropathol* 2018). However, other miRNAs exist targeting synaptic genes in humans, which were not taken into consideration in the project proposal. Thus, to increase the chance to identify vesicular miRNAs reflecting/predicting cognitive symptoms in MS patients, a large effort was initially devoted to expand the list of miRNAs with validated synaptic targets in humans to 14 candidates, the maximum number of miRNAs analyzable by our qPCR approach. Once selected, the 14

miRNAs were measured in both total and myeloid EVs isolated from frozen plasma of two small cohorts of cognitively impaired and cognitively preserved MS patients, recruited at IRCCS Fondazione Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico of Milan and at the VU Medical Center in Amsterdam. Cognitive functions were assessed by a short version of the Rao Battery in the Italian cohort or by a battery of 7 neuropsychological tests, measuring the most affected cognitive domains, in the Dutch cohort. Cognitively impaired/preserved classification was corrected for age, sex and education. The analysis revealed differential expression pattern of two miRNAs, enriched in myeloid cells, i.e. miR-150-5p and let7b-5p, in myeloid EVs from cognitively impaired versus cognitively preserved MS patients. Specifically, myeloid EVs from cognitively impaired patients expressed higher levels of miR-150-5p and lower levels of let-7b-5p compared to preserved patients.

## CONCLUSIONS

By showing that EVs produced by inflammatory microglia (i-EVs) cause alterations of synaptic plasticity in vivo, our data fully confirmed our expectations that i-EVs contribute to cognitive dysfunction, revealing a possible mechanism underlying impaired cognition in MS patients.

Our transcriptomic data indicate that let-7b-5p and miR-150-5p profiling in myeloid EVs may represent a useful tool to measure cognitive dysfunction in MS, and could improve monitoring of disease course. However, larger cohorts of cognitively preserved and cognitively impaired patients are required to corroborate our findings.

We predict that future identification of the synaptic and/or myeloid targets controlled by miR-150-5p and let-7b-5p in brain tissue from cognitive impaired patients will also pave the way to novel disease modifying therapies targeting cognition. Indeed, while we are equipped with appropriate therapeutic options to prevent immune-cell driven relapses, effective therapies to prevent neurodegenerative processes and cognitive disabilities are still missing.





## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Martina G, Prada I, Joshi P, Falcicchia C, D'Arrigo G, Rutigliano G, Zenatelli R, Tozzi F, Radeghieri A, Arancio O, Origlia N, Verderio C. Microglial large extracellular vesicles propagate early synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain*, under revision
- Scaroni F, Visconte C, Serpente M, Golia MT, Gabrielli M, Huiskamp M, De Riz M, Pietroboni A, Rotondo E, Scarpini E, Galimberti D, van Dam M, de Jong BA, Fenoglio C, Verderio C. miR-150-5p and let-7b-5p in blood myeloid extracellular vesicles track cognitive symptoms in multiple sclerosis patients. Submitted for publication
- Verderio C. Dual contribution of microglia to myelin lesion: role of extracellular vesicles. 12th Hershey Conference on Developmental Brain Injury. Marstrand, Sweden. June 2020 (cancelled due to Covid)
- Targeting purinergic receptors to promote damage resolution and repair in neurodegenerative diseases. 40° SIF Meeting. Symposium, virtual event, Milan, March 2021
- Gabrielli M. The emerging role of microRNAs in experimental and clinical multiple sclerosis. Symposium (under 40): Extracellular vesicle miRNAs track cognitive symptoms in multiple sclerosis patients. 19th SINS National Congress, virtual event, September 2021

### Invited lectureships/symposium talks

- Verderio C. Role of microglia-derived extracellular vesicles in white and grey matter lesions in multiple sclerosis. Seminars bridging the clinics to the bench Multiple Sclerosis, Trento March 2019
- Verderio C. Dual role of microglia in white and grey matter lesions in multiple sclerosis. Sapienza Università di Roma, PhD workshop, Frascati, June 2019
- Verderio C. Extracellular vesicle and neuronal cells. 3jENS, 17-21 Cell based therapy and neuronal injury. Maastricht, September 2019
- Verderio C. Dual contribution to myelin lesion of extracellular vesicles released from microglia upon ATP stimulation. 1st European Purine meeting. Santiago De Compostela, September 2019

### Posters

- miR-150-5p and let-7b-5p in blood myeloid extracellular vesicles track cognitive symptoms in multiple sclerosis patients. 2nd EVITA Meeting, Il Ciocco, Barga, Lucca, September 2021
- miR-150-5p and let-7b-5p in blood myeloid extracellular vesicles track cognitive symptoms in Multiple Sclerosis patients. 2021 NeuroMi Virtual Annual Meeting, November 9th-10th 2021

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 144.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 144,000

# Ruolo della placenta sull'asse RANK-RANKL-OPG nella sclerosi multipla: uno studio pilota



## Francesca Ietta

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Siena, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Leonardo Ermini, Sofia Passaponti**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Luca Battistini**, Unità di Neuroimmunologia, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

**Santina Cutrupi**, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, Orbassano, Torino, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Numerosi studi epidemiologici condotti nel corso degli anni rivelano una compatibilità tra gravidanza e sclerosi multipla (SM). La SM non compromette la possibilità di avere figli e non rappresenta un rischio per la salute del bambino. D'altra parte, la gravidanza non peggiora l'attività della malattia ed è associata a un sostanziale suo miglioramento, più evidente durante il terzo trimestre di gestazione, mentre una ricaduta della malattia si verifica nel periodo post partum quando la SM riprende il suo decorso tornando ai livelli pre-gravidici. Pertanto, c'è un profondo cambiamento nell'attività della SM durante e dopo la gravidanza, con miglioramenti e peggioramenti rispettivamente; lo studio dell'effetto biologico della gravidanza offre quindi un'interessante opportunità per comprendere i meccanismi molecolari sottostanti che potrebbero essere eventualmente replicati come terapie per la SM.

La gravidanza è un periodo di profondi cambiamenti nella fisiologia della madre che sono in gran parte orchestrati dalla placenta, l'organo interposto tra madre e feto con ruoli fondamentali per la gravidanza, la salute materna e quella fetale. La placenta è fonte di un'ampia gamma di fattori biologicamente attivi, inclusi steroidi, citochine, glicoproteine associate alla gravidanza, acidi nucleici e vescicole extracellulari che svolgono azioni locali nell'utero, ma anche effetti che si estendono a tutti gli organi e sistemi materni. È interessante notare che il pool di molecole prodotte dalla placenta cambia durante la gravidanza, con specifici segnali placentari prodotti in particolari periodi della gestazione a seconda dell'ambiente ormonale che caratterizza le sue diverse fasi. La SM materna non si associa a un'interfaccia utero-placentare alterata né ad anomalie a carico della placenta.

Su queste basi, abbiamo ipotizzato che nel terzo trimestre di gravidanza una placenta sana e funzionale rilasci nella circolazione materna fattori i cui effetti sulle madri con SM potrebbero contribuire alla remissione transitoria della malattia con l'intento di identificare percorsi molecolari di potenziale utilità terapeutica.

Il nostro progetto si è concentrato su un noto sistema recettore/ligando/recettore esca, come quello composto da "receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B" (RANK), dal suo ligando (RANKL) e dal recettore esca Osteoprotegerina (OPG) mai studiato in modo integrato nel contesto della SM, della gravidanza e della placenta. A livello molecolare, l'interazione di RANK-RANKL, che porta all'attivazione di diverse vie a valle, è finemente controllata da OPG che lega RANKL e lo rende non disponibile per il recettore RANK. L'attivazione di RANK è indotta da RANKL esposto su membrana e dalla sua forma solubile, sRANKL, che insieme all'OPG circolano nel flusso sanguigno in modo equilibrato in condizioni fisiologiche.

Il nostro progetto come studio pilota mirava a determinare la rilevanza della gravidanza nella funzionalità dell'asse RANK-RANKL-OPG nelle donne con SM e indagare il contributo della placenta.

## RISULTATI

Utilizzando colture primarie di espianti placentari, un modello in vitro che mantiene l'architettura dell'unità funzionale dell'organo e imita bene la situazione in vivo, abbiamo dimostrato che la placenta a termine è una fonte preziosa di OPG. Abbiamo anche scoperto che l'estriolo è l'ormone della gravidanza più potente nell'indurre la produzione di OPG placentare. Curiosamente, i nostri studi

hanno evidenziato che la placenta al termine della gestazione produce prevalentemente una forma omodimerica di OPG che mostra una maggiore affinità per RANKL. Abbiamo anche valutato i livelli circolanti di OPG e sRANKL in campioni di siero raccolti da donne in gravidanza e non gravide con SM. Le valutazioni quantitative mostravano un forte aumento dei livelli sierici di OPG proprio nel terzo trimestre di gravidanza rispetto ai valori riscontrati nelle stesse donne un mese dopo il parto. Al contrario, i livelli di sRANKL non mostravano una modulazione correlata alla gravidanza e rimanevano costantemente alti ad ogni tempo considerato e indipendentemente dalla gravidanza. Sulla base della nostra analisi quantitativa nel siero, abbiamo considerato il rapporto sRANKL/OPG nella SM, marker della biodisponibilità di sRANKL. La SM è caratterizzata da un alto rapporto

sRANKL/OPG e i nostri risultati hanno documentato una sua importante diminuzione proprio al termine della gravidanza. Il rapporto sRANKL/OPG nelle donne con SM a termine di gestazione raggiungeva valori paragonabili a quelli dei controlli sani grazie proprio al significativo aumento dell'OPG circolante probabilmente di origine placentare.

## CONCLUSIONI

Nel loro insieme, i nostri risultati mostrano che la gravidanza a termine attraverso la produzione placentare di un OPG dimerico può regolare la biodisponibilità di RANKL, quindi la segnalazione RANK-RANKL e suggeriscono l'asse RANK-RANKL-OPG come una via di segnalazione che merita ulteriori indagini nel contesto di SM.

# The role of the placenta on the RANK-RANKL-OPG axis in multiple sclerosis: a pilot study

## INTRODUCTION AND AIMS

Numerous epidemiological studies conducted over the years reveal the compatibility between pregnancy and multiple sclerosis (MS). MS does not compromise the possibility of having children and does not represent a health risk for the child. On the other hand, pregnancy does not worsen the disease activity and is associated with a substantial decrease in the relapse rate, most prominent during the third trimester of gestation. A resurgence of the disease occurs in the post-partum period when the disease resumes its course returning to pre-pregnancy levels. Thus, there is a profound change in MS disease activity during and after pregnancy, with improvements and worsening respectively; therefore, studying the biological effect of pregnancy provides an intriguing opportunity to understand the underlying molecular mechanisms that could be eventually replicated as therapies for MS. Pregnancy is a period of profound changes in the physiology of the mother that are largely orchestrated by the placenta, the organ interposed between the mother and the fetus with fundamental roles for pregnancy, maternal and fetal health. The placenta is the source of a wide range of biologically active factors, including steroids, cytokines, pregnancy-associated glycoproteins, cell-free nucleic acids, and extracellular vesicles that have local actions into the uterus but also effects on all maternal organs and systems.

It is noteworthy that the pool of molecules produced by the placenta changes throughout pregnancy, with specific placental signals produced at particular periods of gesta-

tion according to the hormonal milieu characterizing the different stages of pregnancy.

Interestingly, maternal MS does not associate with an altered uterine-placental interface or abnormalities in the placenta.

On these bases, we hypothesized that in the third trimester of pregnancy, a healthy and functional placenta releases factors into the maternal circulation whose effects on mothers with MS might contribute to the transient remission of the disease with the intent to identify molecular pathways of potential therapeutic utility.

Our project focused on a well-known receptor/ligand/decoy receptor system, such as the one composed by the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK), its ligand (RANKL) and the decoy receptor Osteoprotegerin (RANK-RANKL-OPG) which has never been investigated in an integrated way in the context of MS, pregnancy, and placenta. At the molecular level, the interaction of RANK-RANKL, leading to the activation of several downstream pathways, is finely controlled by OPG which binds RANKL and makes it unavailable for the RANK receptor. RANK activation is induced by membrane-bound RANKL and its soluble form, sRANKL, which together with OPG circulate in the bloodstream in a balanced manner under physiological conditions.

Our project as a pilot study aimed to determine the relevance of pregnancy in the functionality of the RANK-RANKL-OPG axis in women with MS and investigate the contribution of the placenta.

## RESULTS

By using primary cultures of placental explants, an in vitro model that maintains the architecture of the functional unit of the organ and well mimics the in vivo situation, we demonstrated that the placenta at term is an invaluable source of OPG. We also found that estradiol is the most potent pregnancy hormone to induce OPG production by the placenta. Intriguingly, we have also discovered that the placenta at term of gestation predominantly produces a homodimeric form of the OPG that showed a greater affinity for RANKL.

We have also evaluated the circulating levels of the OPG and sRANKL in serum samples collected from pregnant and non-pregnant women with MS. We observed a major increase in serum OPG levels precisely in the third trimester of pregnancy compared with values found in the same women one month after delivery. In contrast, sRANKL levels did not show pregnancy-related modulation and

remained consistently high at all times considered and regardless of pregnancy. Based on our quantification analysis in the serum, we considered the sRANKL/OPG ratio in MS, a marker of sRANKL bioavailability. MS is characterized by a high sRANKL/OPG ratio, and our results have documented its significant decrease at term of gestation. The sRANKL/OPG ratio in pregnant women with MS reached values comparable to those of healthy controls thanks to the significant increase in circulating OPG probably of placental origin.

## CONCLUSIONS

Taken together, our results show that full-term pregnancy through the placental production of a dimeric OPG can regulate RANKL bioavailability, hence RANK-RANKL signaling and suggest the RANK-RANKL-OPG axis as a signaling pathway that deserve further investigation in the context of MS.



### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Passaponti S, Ermini L, Acconci G, Severi FM, Romagnoli R, Cutrupi S, Clerico M, Guerrera G and Ietta F. The role of the placenta on the RANK-RANKL-OPG axis in Multiple Sclerosis. Manuscript in submission*
- *Passaponti S, Ermini L, Battistini L, Cutrupi S, Severi FM, Ietta F. The role of the placenta on the RANK-RANKL-OPG axis in Multiple Sclerosis: a pilot study. Poster presentation. Italian MS Society and its Foundation Annual Scientific Congress - October 26-28, 2021, Rome, Italy*

#### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

# Il ruolo dei progenitori neurali delle meningi nella regolazione delle cellule autoimmuni del cervello



## Ilaria Decimo

*Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, sezione di Farmacologia, Università degli studi di Verona, Verona, Italia*

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Stefania Zorzin, Francesca Ciarpella, Marzia Di Chio, Emanuela Bottani, Andrea Corsi**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Gabriela Constantin**, *Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia*

**Francesco Bifari**, *Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università di Milano, Milano, Italia*

**Lucas Shrimmer**, *Department of Neurology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC), che provoca demielinizzazione nelle strutture del SNC, presenza di cellule infiammatorie e danni assonali a livello della materia bianca e grigia del cervello e del midollo spinale. La patogenesi della SM è estremamente complessa e i linfociti T svolgono un ruolo significativo nella progressione della malattia. Tali cellule immunitarie agiscono attraverso diversi meccanismi quali il danno diretto indotto dalle citochine e l'attivazione indiretta di neutrofilii, cellule B e macrofagi. Ne consegue una perdita dell'omeostasi immunitaria e dell'auto-tolleranza e una risposta infiammatoria patologica nei confronti delle componenti strutturali del SNC. Le leptomeningi rappresentano un "check-point" in cui le cellule T reattive sono autorizzate a entrare nel parenchima del SNC e successivamente a danneggiare il tessuto neurale. L'infiammazione delle leptomeningi supporta ulteriormente il richiamo delle cellule T e la loro migrazione nel parenchima del SNC.

Inoltre, le leptomeningi sono una struttura più complessa, in grado di modulare la morfogenesi e la funzione del SNC in risposta a condizioni sia fisiologiche che patologiche. Recentemente abbiamo identificato una nuova popolazione di cellule staminali neurali (NSC) nelle meningi, capaci di migrare, differenziare in neuroni funzionali e integrarsi a livello della corteccia. Tali progenitori neuronali svolgono non solo un ruolo neurogenico, ma contribuiscono anche al mantenimento dell'omeostasi cerebrale. Lo scopo

di questo progetto FISM è stato lo studio delle funzioni non neurogeniche (immunitarie e trofiche) dei progenitori neuronali delle meningi sia in condizioni fisiologiche che nella progressione della SM.

## RISULTATI

Al fine di studiare le funzioni non neurogeniche (immuni e trofiche) dei precursori neurali della meninge nella progressione della sclerosi multipla, abbiamo utilizzato il modello murino di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). Tale studio ha evidenziato come le meningi e le popolazioni cellulari che le compongono cambino drasticamente in seguito all'instaurarsi della malattia. In particolare, in risposta alla malattia, abbiamo osservato un aumento nel numero dei precursori neuronali della meninge e un cambiamento del loro fenotipo. Inoltre, abbiamo evidenziato un aumento e un accumulo sia di cellule immunitarie residenti che circolanti, sia di progenitori neuronali in alcune regioni specifiche delle meningi attraverso le quali le cellule neuronali entrano nel parenchima. I dati ottenuti nel corso di questo progetto FISM suggeriscono quindi un ruolo delle meningi come possibile via di ingresso per le cellule infiltranti nel parenchima cerebrale durante lo sviluppo e la progressione dell'EAE. Inoltre, abbiamo osservato come le cellule neurali fossero in stretto contatto con le cellule immunitarie e acquisissero l'espressione di alcuni marcatori dell'immunità. Per comprendere l'interazione molecolare tra i precursori neuronali e le cellule immunitarie nelle meningi, abbiamo eseguito un'analisi

trascrittomico a livello di singola cellula di tutte le popolazioni cellulari presenti nelle meningi in diversi stadi della malattia. Tale analisi ci ha permesso di identificare i determinanti molecolari dell'interazione specifica tra cellule immunitarie e i precursori neuronali.

Complessivamente questi dati suggeriscono un possibile ruolo della meninge come check-point immunitario coinvolto nello sviluppo e nella progressione dell'EAE. L'interazione molecolare tra cellule immunitarie e neuronali nelle meningi potrebbe rappresentare un nuovo target farmacologico per il trattamento della sclerosi multipla.

## CONCLUSIONI

Il progetto finanziato mette in risalto la funzione della meninge nella progressione della sclerosi multipla evidenziando il ruolo di una nuova popolazione di precursori neuronali. I precursori neuronali nelle meningi sono in stretto contatto con le cellule immunitarie e acquisiscono alcuni marcatori importanti per l'interazione con l'immunità. Inoltre, l'identificazione attraverso analisi trascrittomico di un meccanismo molecolare per l'interazione tra l'immunità e i precursori neuronali nella meninge potrebbe rappresentare un nuovo target farmacologico per il trattamento della sclerosi multipla.

# The role of meningeal neural progenitor cells in brain auto-reactive immune cell regulation

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory neurodegenerative disease of the Central Nervous System (CNS), characterized by inflammatory infiltrates, demyelinating plaques, and axonal damage that occur in white and grey matter of the brain and spinal cord. Pathogenesis of MS is extremely complex, and it is characterized by the loss of immune homeostasis and self-tolerance. In general, MS pathogenesis is mediated by T cells through several mechanisms such as direct cytokine-induced damage and other in indirect mechanisms such as activation of different cell types like B cells, neutrophils and macrophages. This condition led to infiltration of activated peripheral mononuclear cells in brain and spinal cord, causing an unregulated pathologic inflammatory response toward structural components of the CNS. Leptomeninges represent a checkpoint at which activated brain-reactive T cells are licensed to enter the CNS parenchyma and subsequently to damage neural tissue. Inflammatory activation of leptomeninges further supports T cell attachment and migration into the CNS parenchyma.

Beside this role, leptomeninges have emerged as more complex structure able to modulate CNS morphogenesis and function in response of both physiological and pathological conditions. We have identified a novel neural stem cell (NSC) population present in meningeal substructures that migrate to the cortex and differentiate into functional integrated neurons. Of note, meningeal-resident NPCs exert relevant non-neurogenic functions contributing to the maintenance of the brain homeostasis. With this project, we aimed to investigate the non-neurogenic (immune and trophic) functions of meningeal neural precursor cells in physiological conditions and in the progression of the MS disease.

## RESULTS

In order to investigate the non-neurogenic (immune and trophic) functions of meningeal neural precursor cells in multiple sclerosis progression, we analysed the meninges of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mice model. We found that meningeal niche cell population changed following EAE. Neural precursor cells in meninges increased and changed their phenotype during disease progression, acquiring immune cell features. Following EAE, both resident and blood born immune cells increased in meninges, and they accumulated together with NPCs in specific region of meninges. Our data identified meningeal specific region as a possible entry route for the brain parenchyma infiltrating cells during EAE progression. We confirmed that NPCs in meninges changed their phenotype and induced the expression of immune-related markers, indicating a potential direct crosstalk with immune cells following EAE disease. To understand the molecular interaction between NPCs and immune cells in meninges, we performed a single cell transcriptomic analysis of meningeal cells at different disease stages. Importantly, we found the molecular determinants of specific NPC-immune cell interaction occurring in EAE.

Altogether these data suggest a possible role of the meningeal niche including both immune and stromal cells as immune check-point involved in EAE disease, development and progression. The molecular interaction between immune and neural cells in meninges may represent a new pharmacological target to treat multiple sclerosis.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our project delineates a new role of meningeal neural precursor cells in the progression of MS. The expression by meningeal neural precursors of mo-

lecules that are usually associated with immune system suggested the existence of a crosstalk between NSCs and immune cells. Additionally, the identification through transcriptomic analysis of the molecular mechanisms re-

gulating the interaction between NSCs and immune cells could represent a new pharmacological target for MS and it may be promising for the development of novel therapy.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Decimo I, Dolci S, Panuccio G, Riva M, Fumagalli G, Bifari F. "Meninges: A Widespread Niche of Neural Progenitors for the Brain", *Neuroscientist*. 2021 Oct;27(5):506-528. doi: 10.1177/1073858420954826. Epub 2020 Sep 16
- XXIX AINI Congress, Verona, 16-19 September 2021. The role of meningeal stromal cells in brain auto-reactive immune cell regulation. Decimo I
- 52nd Congress of the Italian Society of Multiple Sclerosis (FISM), 26 -27 Nov 2020. "The role of meningeal neural progenitor cells in brain auto-reactive immune cell regulation." Zorzin S, Dusi S, Lopez N, Lucianer G, Corsi A, Poli A, Constantin G, Fumagalli G F, Bifari F & Decimo I
- 51st Congress of the Italian Society of Multiple Sclerosis (FISM), Roma (Italy), 28 -30 May 2019. "The role of meningeal neural progenitor cells in brain auto-reactive immune cell regulation." Zorzin S, Dusi S, Lopez N, Gravagno E, Corsi A, Constantin G, Fumagalli G F, Bifari F & Decimo I.
- "The role of meninges and meningeal neural stem cells in health and disease" Zorzin S, PhD thesis in Neuroscience, academic year 2021/2022, University of Verona
- "The role of meninges and meningeal stem cell in a murine model of EAE" Lucianer G., Master thesis in Molecular and medical biotechnology, academic year 2019/2020, University of Verona

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 66.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 1 year) and the amount of € 66,000



# Caratterizzazione delle interazioni neutrofilo-astrocita nella encefalomyelite sperimentale autoimmune



**Elena Zenaro**

Dipartimento di Medicina, Università degli studi di Verona, Verona, Italia

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Nicola Lopez, Laura Fumagalli, Anna Slanzi, Alessandro Bani, Gabriele Angelini**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Prove recenti suggeriscono un ruolo dannoso per i leucociti neutrofili nella sclerosi multipla (SM) e nel suo modello animale, l'encefalomyelite sperimentale autoimmune (ESA). Tuttavia, i meccanismi che portano al danno del sistema nervoso centrale (SNC) dipendente dai neutrofili non sono chiari. Una volta entrati nel parenchima del SNC, è probabile che i neutrofili contattino le cellule neuronali, ma la natura di queste interazioni è sconosciuta. I nostri dati mostrano che i neutrofili stabiliscono contatti con gli astrociti nel SNC dei topi ESA. Tuttavia, il modo in cui gli astrociti regolano le funzioni dei neutrofili e, reciprocamente, come i neutrofili che invadono il sito della lesione nel SNC possano influenzare l'attivazione degli astrociti durante l'induzione e la progressione della malattia nella SM e nell'ESA è completamente sconosciuto. I nostri interessanti dati preliminari mostrano che numerosi neutrofili si accumulano nel tessuto del midollo spinale e interagiscono con gli astrociti al picco di malattia nell'ESA indotto con il peptide MOG. Inoltre, i nostri risultati preliminari suggeriscono che la glicoproteina TIM (immunoglobulina delle cellule T e dominio mucinico)-1 può mediare i contatti neutrofilo-astrocita nell'ESA. Infatti, al picco della malattia sia i neutrofili attivati che gli astrociti esprimono la glicoproteina TIM-1, suggerendo che questa molecola può mediare i contatti neutrofilo-astrocita durante l'ESA. È da notare che dati pubblicati in letteratura mostrano un aumento di TIM-1 solubile nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM, e suggeriscono che TIM-1 possa rappresentare un meccanismo molecolare chiave nella neuroinfiammazione e nello sviluppo della SM. Nel presente progetto pilota, il nostro obiettivo principale era quello di studiare l'interazione sconosciuta tra i neutrofili e gli astrociti durante l'ESA. Mediante tecniche di micro-

scopia avanzata *in vivo* ci siamo proposti di identificare nuovi meccanismi cellulari e molecolari che controllano la patogenesi della malattia autoimmune del SNC, e di studiare l'effetto del blocco di questi contatti sulla progressione di malattia in modelli murini di ESA.

## RISULTATI

Abbiamo eseguito esperimenti di microscopia *in vivo* per valutare il ruolo delle molecole di adesione nel midollo spinale (MS) durante l'ESA all'esordio della malattia. I nostri dati suggeriscono che i neutrofili usciti dal vaso sanguigno e penetrati nel SNC sono debolmente mobili e sono coinvolti in interazioni con le cellule residenti nel SNC. Dopo la somministrazione locale di un anticorpo bloccante contro il TIM-1, i neutrofili aumentano la loro velocità e direzionalità, suggerendo che il comportamento della motilità cellulare è dipendente da TIM-1. In maniera simile, anche l'anticorpo bloccante l'integrina LFA-1 ha influenzato il movimento dei neutrofili, ma a differenza del blocco ottenuto su TIM-1, l'integrina LFA-1 ha generato una partizione delle cellule nello spazio extravascolare, portando a una progressiva riduzione della porzione di neutrofili che si muoveva lentamente. Complessivamente, questi dati suggeriscono che sia il blocco di TIM-1 che quello di LFA-1 ha influenzato drasticamente il movimento dei neutrofili nelle prime fasi dell'ESA, portando a una maggiore velocità e direzionalità.

Per capire meglio come i neutrofili contribuiscono al danno del SNC, abbiamo anche eseguito una caratterizzazione *ex vivo* del fenotipo dei neutrofili circolanti e infiltranti il MS nella fase iniziale dell'ESA utilizzando la "citometria multicolore a flusso". I nostri dati mostrano la presenza di un fenotipo dannoso di neutrofili chiamato "aged" (CXCR4hi CD62Llo) nei neutrofili in circolo, che in

precedenza è stato dimostrato promuovere l'infiammazione cronica sistemica. Inoltre, nel MS, abbiamo trovato un'ampia percentuale di neutrofili che esprimono alti livelli di ICAM-1, suggerendo la presenza di un fenotipo pro-infiammatorio e neurotossico che potrebbe essere responsabile della lesione del SNC osservata nei topi ESA. È interessante notare che la mucina TIM-1 è risultata essere la seconda molecola più fortemente espressa sulla superficie dei neutrofili infiltranti il MS, suggerendo una correlazione precedentemente sconosciuta tra l'espressione di TIM-1 e il fenotipo attivato e potenzialmente neurotossico delle cellule che invadono il MS. Inoltre, l'analisi della distribuzione spaziale *ex vivo* nel MS dei topi ESA ha rivelato che i neutrofili che esprimono TIM-1 risiedono vicino alle meningi, suggerendo così che i neutrofili possono invadere il parenchima nel MS attraverso le meningi, e con dei meccanismi dipendenti da TIM-1.

Per caratterizzare meglio le interazioni tra i neutrofili e gli astrociti, abbiamo settato un nuovo sistema di co-cultura *in vitro* con cellule purificate dal MS di topi ESA per supportare e chiarire i risultati ottenuti *ex vivo*. Utilizzando la microscopia a deconvoluzione wide-field in esperimenti di *in vivo* imaging abbiamo osservato i neutrofili in contatto

fisico con gli astrociti, e abbiamo anche osservato un aumento del segnale fluorescente per TIM-1 e LFA-1 lungo i confini di contatto tra i neutrofili e gli astrociti, suggerendo un ruolo per queste molecole di adesione nel contatto cellula-cellula.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati preliminari suggeriscono che le interazioni TIM-1-TIM-1 possono mediare il contatto neutrofilo-astrocita nell'ESA. Un anticorpo anti-TIM-1 è attualmente in fase di sperimentazione in pazienti con carcinoma renale e altri tumori che esprimono TIM-1, suggerendo che questo approccio potrebbe essere potenzialmente utilizzato nei pazienti con SM. Inoltre, dati pubblicati di recente che mostrano un aumento di TIM-1 solubile nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM suggeriscono che TIM-1 possa rappresentare un meccanismo molecolare chiave nella neuroinfiammazione e nello sviluppo della SM. Pertanto, l'interferenza con i contatti neutrofilo-astrocita mediante iniezione intratecale di anticorpi anti-TIM-1, o altri approcci che bloccano queste interazioni, potrebbero essere proposti per ridurre la neuroinfiammazione e il danno tissutale nella SM.

# Characterization of neutrophil-astrocyte interplay in experimental autoimmune encephalomyelitis

## INTRODUCTION AND AIMS

Recent evidence suggests a detrimental role for neutrophils in multiple sclerosis (MS) and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). However, the mechanisms leading to neutrophil-dependent central nervous system (CNS) damage are unclear. Once extravasated in the CNS parenchyma, neutrophils likely contact neuronal cells, but these interactions are largely unknown. Our data show that neutrophils establish contacts with astrocytes in the CNS of EAE mice. However, how astrocytes regulate neutrophil functions, and reciprocally, how neutrophils invading the site of CNS injury can influence the evolution of astrocytes reactivity during disease induction and progression in MS and EAE is completely unknown. Our interesting preliminary data show that numerous extravasated neutrophils inside the SC parenchyma establish physical contacts with astrocytes at disease peak in MOG-induced EAE. Also, our preliminary results suggest that TIM (T cell immunoglobulin and mucin domain)-1 glycoprotein may mediate neutrophil-astrocyte contacts in EAE. Indeed, activated neutrophils as well as astrocytes at the disease peak express TIM-1 glycoprotein, suggesting this molecule may mediate neutrophil-astrocyte contacts during EAE. Notably, previous

published data showing increase of soluble TIM-1 in the CSF of MS patients suggest that TIM-1 may represent a key molecular mechanism in neuroinflammation and MS development. In the present pilot project, our main goal was to study the unknown interplay between neutrophils and astrocytes during EAE. By means of *in vivo* advanced microscopy we aimed to identify new cellular and molecular mechanisms controlling the pathogenesis of CNS autoimmune diseases, and to study the effect of blockade of these contacts on EAE.

## RESULTS

We performed *in vivo* microscopy experiments to evaluate the role of adhesion molecules in the spinal cord (SC) during EAE at disease onset. Our data suggest that extravascular neutrophils are weakly motile and are engaged in interactions with CNS resident cells, swarming around a fixed point. After the local administration of an anti-TIM-1 blocking antibody, neutrophils increased their velocity and directedness, suggesting that cell motility behavior is TIM-1-dependent. In addition, also the anti-LFA-1 blocking antibody affected the neutrophil movement, but differently from the TIM-1 blockade, the integrin LFA-1 led to a partitioning of cells in the extra-vascular space,

leading to a progressive reduction of the portion of neutrophils that were moving slowly. Altogether, these data suggest that both TIM-1 and LFA-1 blockade drastically affected neutrophil dynamics at the early phases of EAE, leading to increased velocity and directedness.

To better understand how neutrophils contribute to CNS damage, we also performed an *ex vivo* characterization using multicolor flow cytometry of the phenotype of circulating and SC-invading neutrophils in the early phase of EAE. Our data show the presence of the harmful aged neutrophil phenotype (CXCR4<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>) in circulating neutrophils, which has been previously shown to promote systemic chronic inflammation. Moreover, in the SC, we found a large proportion of neutrophils highly expressing ICAM-1, suggesting the presence of a pro-inflammatory and neurotoxic phenotype that may be responsible for the observed CNS lesion in EAE mice. Interestingly, the mucin TIM-1 was found to be the second most strongly upregulated molecule on the surface of SC-infiltrating neutrophils, suggesting a previously unknown correlation between TIM-1 expression and the activated phenotype of the SC invading cells. Moreover, the *ex vivo* spatial distribution analysis in the SC of EAE mice revealed that TIM-1 expressing neutrophils reside nearby the meninges, thus suggesting that neutrophils may invade the SC parenchyma through the meninges and with a TIM-1-dependent mechanisms.

To better characterize the interactions between neutrophils and astrocytes, we set up a new *in vitro* co-culture system with purified cells from SC of EAE mice to support and clarify the results obtained *ex vivo*. Using wide-field deconvolution microscopy, live imaging experiments revealed neutrophils in physical contact with astrocytes, and we observed an increased fluorescent signal for TIM-1 and LFA-1 along the contact borders between neutrophils and astrocytes, suggesting a role for these adhesion molecules in cell-cell engagement.

## CONCLUSIONS

Our preliminary results suggest that TIM-1-TIM-1 interactions may mediate neutrophil-astrocyte interplay in EAE. An anti-TIM-1 antibody is currently being tested in patients with renal carcinomas and other TIM-1 expressing tumors, suggesting this approach may be potentially used in MS patients. Also, recent published data showing increase of soluble TIM-1 in the CSF of MS patients suggest that TIM-1 may represent a key molecular mechanism in neuroinflammation and MS development. Thus, interfering with neutrophil-astrocyte contacts by intrathecal injection of anti-TIM-1 antibodies, or other approaches blocking these interactions, may reduce neuroinflammation and tissue damage in MS.

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 24.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 24,000

# Il ruolo del DNA extracellulare rilasciato dai linfociti T helper (THREDs) nell'infiammazione autoimmune e nella neurodegenerazione del sistema nervoso centrale



## Massimo Costanza

Dipartimento di Neuroscienze Cliniche, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Francesca Colciaghi, Carlotta Scarpa, Emilio Ciusani**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Sabina Sangaletti, Unità di Immunologia Molecolare, Dipartimento di Ricerca, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'etiologia e i meccanismi patogenetici della sclerosi multipla (SM) non sono ancora del tutto compresi, tuttavia numerose evidenze indicano i linfociti T come promotori chiave dell'immunopatogenesi di questa malattia. Pertanto, la comprensione dei meccanismi biologici tramite i quali i linfociti T sostengono la propria attività infiammatoria potrebbe fornire importanti spunti per la messa a punto di nuovi trattamenti per la SM. Abbiamo recentemente identificato un nuovo processo di co-stimolazione intrinseca nei linfociti T CD4+ naïve murini, basato sull'estrusione di filamenti di DNA ossidato, che sono stati denominati filamenti di DNA rilasciati dai linfociti T helper (THREDs). Queste fibre, prevalentemente costituite da DNA mitocondriale, sono estruse in seguito ad attivazione e trasmettono segnali di infiammazione sterile che amplificano le risposte dei linfociti T CD4+ in modo autocrino. L'inibizione farmacologica delle specie reattive dell'ossigeno di origine mitocondriale attenua l'estrusione dei THREDs da parte dei linfociti T CD4+ naïve, riducendo la produzione di citochine *in vitro* e il priming contro la mielina *in vivo* nell'encefalite autoimmune sperimentale (ESA) cronica, un modello sperimentale di SM. Tuttavia, ad oggi, non ci sono informazioni sul fatto che questo processo infiammatorio sia utilizzato anche dai linfociti T helper umani. In questo progetto di ricerca abbiamo cercato di caratterizzare la composizione e il meccanismo di estrusione dei filamenti di DNA rilasciati dai linfociti T CD4+ umani e di analiz-

zarne il potenziale infiammatorio. Infine, abbiamo mirato a validare una strategia terapeutica basata sull'inibizione del rilascio del DNA extracellulare per il trattamento di un modello sperimentale di SM.

## RISULTATI

Al fine di verificare se i linfociti T helper umani rilasciano fibre di DNA extracellulare, le cellule T CD4+ purificate da donatori sani sono state attivate *in vitro* con due differenti stimoli policlonali, ossia gli anticorpi anti-CD3/CD28 e la PMA/Ionomicina. Indipendentemente dalla modalità di attivazione, i linfociti T CD4+ rilasciano sia filamenti sottili di DNA associati al fattore A di trascrizione mitocondriale (TFAM), che spesse fibre di cromatina decorate con l'istone H3 citrullinato (CitH3), le ultime a formare delle reti tra cluster di cellule, spesso associate alla rottura della membrana cellulare. Queste due differenti tipologie di filamenti di DNA extracellulare rilasciate dai linfociti T CD4+ ricordano rispettivamente il rilascio vitale di DNA mitocondriale originariamente descritto negli eosinofili, e il processo di morte cellulare infiammatoria denominato ETosi, il quale consiste nell'estrusione di fibre di cromatina decondensata associate a istoni e proteine antimicrobiche, dette "trappole extracellulari" (ETs). Da notare, abbiamo trovato che i linfociti T CD4+ esprimono sia a livello di trascritto che di proteina la peptidil arginina deiminasi (PAD)4, l'enzima chiave nel mediare la citrullinazione dell'istone e la formazione degli ETs nei neutrofilii. Per comprendere più

a fondo l'origine di queste differenti estrusioni di DNA, abbiamo purificato i linfociti T CD4+ umani naïve e della memoria e ne abbiamo esaminato il rilascio di DNA extracellulare. È interessante notare che, mentre i linfociti T CD4+ naïve secernono prevalentemente filamenti di DNA TFAM+, i linfociti T CD4+ della memoria rilasciano principalmente fibre di DNA CitH3+. Inoltre, il trattamento dei linfociti T CD4+ umani con un inibitore selettivo del PAD4 riduce la formazione delle trappole di DNA CitH3+, ma non dei filamenti TFAM+. La compromissione delle fibre di DNA extracellulare derivate dai linfociti T CD4+ attraverso l'esposizione alla DNAsi o a un inibitore del PAD4 si traduce in una significativa riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'IFN- $\gamma$  e il TNF- $\alpha$ . Di interesse, anche i linfociti T CD4+ murini attivati rilasciano fibre di DNA CitH3+ in modo PAD4-dipendente. Sulla base dell'evidenza che l'estrusione di trappole di DNA

CitH3+ è un processo infiammatorio tipico dei linfociti T CD4+ della memoria, i quali comprendono i cloni di linfociti T autoreattivi responsabili della patologia autoimmune del sistema nervoso centrale (SNC), abbiamo trattato l'ESA recidivante-remittente dopo l'esordio della malattia con un inibitore selettivo del PAD4 e abbiamo riscontrato che questo migliora significativamente i segni clinici, riducendo sia la gravità della patologia che il tasso di recidive.

### CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio mostrano che i linfociti T CD4+ naïve e della memoria rilasciano diversi tipi di fibre di DNA extracellulare. Il targeting selettivo delle fibre di DNA CitH3+ rilasciate dal compartimento dei linfociti T CD4+ della memoria potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per il trattamento dell'autoimmunità del SNC.

## The role of T-helper-released extracellular DNAs (THREDS) in autoimmune inflammation and neurodegeneration of the central nervous system

### INTRODUCTION AND AIMS

The aetiology and pathogenic mechanisms of multiple sclerosis (MS) are still incompletely understood, however, several lines of evidence have strongly indicated T cells as key drivers of MS immunopathology. Therefore, understanding the biological mechanisms through which T cells sustain their inflammatory activity might provide important insights for developing new treatments for MS. We have recently identified a novel process of intrinsic co-stimulation in mouse naïve CD4+ T cells based on the extrusion of threads of oxidized DNA, which were named T-helper-released extracellular DNAs (THREDS). These fibers, mainly composed of mitochondrial DNA, are extruded upon activation and convey sterile inflammatory signals that amplify CD4+ T cell responses in an autocrine fashion. The pharmacologic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species dampens the extrusion of THREDS by mouse naïve CD4+ T cells, reducing cytokine production *in vitro* and T cell priming against myelin *in vivo* in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental model for MS. However, to date, there is no information on whether this inflammatory process is utilized also by human T helper cells. In this research project, we sought to characterize the composition and the mechanism of extrusion of DNA threads released by human CD4+ T cells and to analyze their inflammatory potential. Last, we aimed at exploring a therapeutic strategy based on the inhibition of the release of extracellular DNA for the treatment of an experimental model of MS.

### RESULTS

To verify whether human T helper cells release extracellular DNA fibers, CD4+ T cells purified from healthy donors were activated *in vitro* with two different polyclonal stimuli, i.e. anti-CD3/CD28 antibodies and PMA/Ionomycin. Independently from the modality of activation, CD4+ T cells secrete both narrow DNA filaments associated with the mitochondrial structural transcription factor A mitochondria (TFAM) and thick chromatin fibers decorated with citrullinated histone 3 (CitH3), the last forming web-like structures among clusters of cells, often associated with the disruption of the cell membrane. These two different kinds of extracellular DNA threads released by CD4+ T cells are reminiscent respectively of the vital release of mitochondrial DNA (mtDNA), originally described in eosinophils, and of the inflammatory cell death process called ETosis, which consists in the extrusion of decondensed chromatin fibers associated with histones and anti-microbial proteins, named "extracellular traps" (ETs). Of note, we found that CD4+ T cells express at both transcript and protein levels the peptidyl-arginine deiminase (PAD)4, the key enzyme mediating histone citrullination and ETs formation in neutrophils. To deeper understand the origin of these different DNA extrusions, we purified human naïve and memory CD4+ T cells and evaluated the release of extracellular DNA. Interestingly, while naïve CD4+ T cells mainly secrete TFAM+ DNA threads, memory CD4+ T cells mostly release CitH3+ DNA fibers. Furthermore, treatment of human CD4+ T cells with a

highly selective PAD4 inhibitor reduces the formation of CitH3<sup>+</sup> DNA traps, but not of TFAM<sup>+</sup> threads. The impairment of CD4<sup>+</sup> T cell-derived extracellular DNA fibers through exposure to DNase or a PAD4 inhibitor results in a significant reduction in the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Interestingly, also activated mouse CD4<sup>+</sup> T cells were found to release CitH3<sup>+</sup> DNA fibers in a PAD4-dependent way. Based on the evidence that the extrusion of CitH3<sup>+</sup> DNA traps is an inflammatory process typical of memory CD4<sup>+</sup> T cells, which encompass autoreactive T cell clones responsible for CNS autoimmune pathology, we treated relapsing-re-

mitting EAE after the onset of the disease with a selective PAD4 inhibitor and found that it significantly ameliorates clinical signs, reducing both disease severity and relapse rate.

## CONCLUSIONS

The results obtained in this study show that naïve and memory CD4<sup>+</sup> T cells release different kinds of extracellular DNA fibers. Selective targeting of CitH3<sup>+</sup> DNA fibers released by the memory CD4<sup>+</sup> T cell compartment might represent a novel therapeutic strategy for treating CNS autoimmune pathology.

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 8 mesi) e l'ammontare di 75.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 8 months) and the amount of € 75,000



**PROGETTI SPECIALI**  
SPECIAL PROJECTS

---



## Introduzione / Introduction

---

AISM, attraverso la sua Fondazione, sostiene, con le proprie risorse, anche la ricerca dedicata a progetti speciali, che coprono specifiche aree d'interesse e riguardano ricerche di ampio respiro, pluriennali che prevedono la compartecipazione e la collaborazione di diversi centri di eccellenza nazionali e/o internazionali. La distribuzione delle tematiche affrontate da tali progetti evidenzia l'impegno a finanziare e promuovere la ricerca e le infrastrutture per rispondere all'Agenda delle Persone con SM.

Di seguito riportiamo un approfondimento sui principali progetti speciali di ricerca in corso suddivisi in ambiti di studio.

*Through its Foundation, AISM also supports, with its own resources, research dedicated to special projects, which cover specific areas of interest and concern multi-year research involving the participation and collaboration of various national and international centers of excellence. The distribution of the research area addressed by these projects highlights the commitment to finance and promote research and infrastructure to respond to the Agenda for People with MS.*

*The following is an in-depth analysis of the main special research projects in progress divided into research areas of study.*

---

# **Medicina personalizzata**

Personalized  
Medicine

---

# MyMood: sviluppo di nuovi patient-reported outcomes sui disturbi dell'umore nella SM.

## Un approccio di co-creazione tramite scienza basata sull'input del e con il paziente



**Federico Bozzoli, Ludovico Pedullà**

*Fondazione Italiana Sclerosi Multipla*

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Giampaolo Brichetto, Federica Molinari, Jessica Podda, Michela Ponzio**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Paolo Confalonieri**, *Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

**Monica Falautano**, *Università Vita Salute H. San Raffaele, Milano, Italia*

**David Korn**, *Fondazione Policlinico Universitario Gemelli IRCCS, Roma, Italia*

**Guendalina Graffigna**, *Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano, Italia*

### PREMESSE E OBIETTIVI

L'umore è una personale disposizione dell'animo, in grado di determinare particolari reazioni emotive che possono essere più o meno stabili. Talvolta però questi cambiamenti e alterazioni possono diventare veri e propri disturbi dell'umore, che condizionano la vita di chi ne è soggetto. I disturbi dell'umore sono comuni nella sclerosi multipla (SM), ma gli strumenti di valutazione esistenti non sono sempre focalizzati su questioni importanti per le persone con SM. La scienza basata sull'input del e con il paziente suggerisce l'importanza del coinvolgimento dei pazienti come co-ricercatori a tutti i livelli del percorso di ricerca, condividendo con altri stakeholder la propria esperienza della malattia, che si traduce in una forma di conoscenza che si integra con la conoscenza scientifica (es. conoscenza esperienziale).

Negli ultimi anni, grande interesse è stato dato ai Patient Reported Outcomes (PRO) nella SM, definiti come strumenti scientifici che riflettono la prospettiva e l'esperienza delle persone con SM in relazione al loro trattamento o condizione di malattia, dando valore e qualità all'informazione che viene dalle persone stesse. Inoltre, diverse iniziative recenti, ad esempio il progetto MULTI-ACT, promuovono una partecipazione informata e di qualità delle persone con SM nei processi decisionali della ricerca e dell'assistenza sanitaria in merito al loro trattamento e alle loro prestazioni.

Gli obiettivi del presente studio sono: (i) definire e testare un modello operativo per la co-creazione di nuovi PRO basati sulla scienza e con l'input del paziente; (ii) sviluppare un nuovo questionario su ansia e depressione basato sul modello sopra menzionato per caratterizzare meglio i disturbi dell'umore nelle persone con SM.

### RISULTATI

Il progetto MyMood è stato sviluppato in 3 Working Package (WP): il primo WP, previsto per tutta la durata dello studio, è relativo alle attività del Team di Coordinamento (Engagement Coordination Team, ECT), responsabile della gestione del coinvolgimento degli stakeholder. L'ECT di MyMood è composto da una persona con SM in un ruolo chiave, un caregiver, ricercatori, un esperto nel coinvolgimento del paziente con esperienza nel progetto MULTI-ACT, medici, psicologi e un metodologo.

I WP2 e WP3 consistevano rispettivamente nell'analisi della letteratura esistente sull'argomento e nella creazione degli item, cioè il processo di formulazione delle domande che costituiscono il questionario stesso.

La prospettiva individuale del rappresentante delle persone con SM è stata integrata con gli input di un gruppo di pazienti che hanno compilato un diario di 10 giorni sullo stato dell'umore. Tra i principali domini correlati alla regolazione dell'umore sono stati identificati: equilibrio emotivo instabile, sovraccarico emotivo, scarsa auto-effi-

cacia, mancanza di comprensione, autoisolamento, senso di colpa, mancanza di speranza, e non accettazione come espressioni di regolazione dell'umore alterate; flessibilità, hardiness, ottimismo, cura di sé, consapevolezza e accettazione come meccanismi di resilienza.

Sulla base di questi punti chiave è stata effettuata una nuova ricerca in letteratura al fine di raccogliere le scale esistenti sugli aspetti individuati (N = 22).

Queste scale e tutto il materiale raccolto hanno guidato il processo di generazione degli item, che è stato eseguito in sessioni multi-stakeholder coordinati dall'ECT e ha prodotto più di 200 item.

Un panel di esperti ha ridotto la prima bozza del questionario, eliminando elementi ridondanti o che coinvolgesero domini diversi da quello indagato, come le funzioni cognitive o motorie. Inoltre, ai membri del panel è stato chiesto di valutare gli elementi dello strumento in termini di pertinenza per il costrutto sottostante lo studio secondo le definizioni teoriche del costrutto stesso e delle sue dimensioni su una scala ordinale a 4 punti (da 1=non rilevante a 4=molto rilevante). L'indice di validità dei contenuti per la rilevanza di ciascun item (I-CVI) è stato ottenuto dividendo il numero di coloro che hanno giudicato l'item rilevante (rating 3 o 4) per il numero degli esperti: se l'I-CVI era superiore al 79%, il l'item è stato ritenuto appropriato; se era tra il 70-79%, doveva essere rivisto; se era inferiore al 70%, veniva eliminato.

Infine, è stata studiata se lo strumento ha validità per gli utenti finali, ossia i pazienti con SM (PcSM). A questo scopo, è stato chiesto a 80 PcSM di identificare gli elementi

che ritenevano fossero i più importanti per loro e di valutarne l'importanza su una scala Likert a 5 punti da molto importante a non importante. Sono stati misurati la percentuale di pazienti che hanno dato un punteggio di 4 o 5 (frequenza) e il punteggio medio di importanza di ciascun elemento (importanza) ed è stato calcolato il punteggio di impatto degli item con la seguente formula: Item Impact Score (IIS) = frequenza × Importanza. Gli item sono stati mantenuti per IIS ≥ 1,5, corrispondenti a una frequenza media del 50% e una a una importanza media di 3 sulla scala Likert a 5 punti.

## CONCLUSIONI

Il processo di coinvolgimento (diari, focus group e interviste) ha confermato l'importanza di indagare la regolazione dell'umore nella SM e, allo stesso tempo, valutare i meccanismi di resilienza messi in atto dalle PcSM per affrontare i problemi legati allo stato dell'umore. Un nuovo PRO su umore e resilienza è stato co-creato dalle PcSM per le PcSM, consentendo di includere domini rilevanti nel questionario seguendo un processo scientifico (le linee guida MULTI-ACT). Le espressioni lessicali sono state sviluppate e convalidate dalle PcSM, in collaborazione con clinici esperti, ricercatori e caregiver al fine di massimizzare la chiarezza, soddisfare le aspettative degli utenti e aumentare l'aderenza futura.

Saranno necessarie ulteriori ricerche per valutare le proprietà psicometriche del nuovo questionario con analisi statistiche appropriate.

# MyMood: developing new patient-reported outcomes on mood disorders in MS. An approach of co-creation through science of and with patient input

## INTRODUCTION AND AIMS

The mood is a personal disposition of the soul, capable of determining particular emotional reactions that can be more or less stable. However, sometimes these changes and alterations can become real mood disorders, which affect the life of those who are subject to them.

Mood disorders are common in multiple sclerosis (MS), but existing assessment tools on this domain are not always focused on issues that matter to PwMS. The science of and with patient input suggests the engagement of patients as co-researchers at every levels of the research path, sharing with other stakeholders their own experience of the disease, which translates into a form of knowledge that integrates with scientific knowledge (i.e., experiential knowledge).

In the last years, great interest has been given to the patient reported outcomes (PROs) in MS, defined as scientific tools that reflect the perspective and experience of PwMS in relation to their disease condition. Moreover, different recent initiatives, e.g., the MULTI-ACT project, promote an informed and quality participation of PwMS in the decision-making processes of research and healthcare regarding their treatment and performance.

Aims of the present study are: (i) to define and test an operational model for co-creation of new PROs based on science of and with patient input; (ii) to develop a new questionnaire on anxiety and depression based on the above mentioned model to better characterize mood disorders in people with MS.

## RESULTS

The project MyMood has been implemented in 3 Working Packages (WP): the first horizontal WP, lasting throughout the whole duration of the study, is related to the activities of the Engagement Coordination Team (ECT), a body in charge of the management of stakeholder engagement. MyMood ECT included a person with MS in a key role, a caregiver, researchers, an expert in patient engagement with MULTI-ACT background, clinicians, psychologists and a methodologist.

WP 2 and 3 consisted in the Landscape analysis and Item generation respectively. Key aspects of both WPs are the capture of the patient experiential knowledge at both individual level (ensured by the presence of a person with MS in the ECT) and at community level. Indeed, all ECT members should ensure representativeness of their community through proper tools such as web survey or in-person interviews.

Concerning WP2, the individual perspective of the representative of PwMS has been integrated with the input of a group of patients who filled in a 10-day diary in mood status.

As a result, the following domains related to mood regulation have been identified: instable mood balance, mood overload, low self-efficacy, lack of understanding, self-isolation, sense of guilt, lack of hope, and non-acceptance as impaired mood regulation expressions; flexibility, hardiness, optimism, self-care, awareness and acceptance as resilience mechanisms. On the bases of these key points, a new search on the literature has been performed in order to collect the existing scales on the identified aspects (N=22).

These scales and all the material collected guided the item generation process, which was performed in multi-stakeholder panel sessions coordinated by the ECT and produced more than 200 items.

A panel of experts reduced the first draft of the questionnaire, eliminating redundant items or those involving different domains such as cognitive or motor functions. Moreover, panel members were asked to rate instrument items in terms of relevancy to the construct underlying study as per the theoretical definitions of the construct

itself and its dimensions on a 4-point ordinal scale (1[not relevant], 2[somewhat relevant], 3[quite relevant], 4[highly relevant]). Content validity index for relevancy of each item (I-CVIs) was obtained by dividing the number of those judging the item as relevant (rating 3 or 4) by the number of experts: if the I-CVI was higher than 79%, the item was considered appropriate; if it was between 70-79%, it needed revision; if it was less than 70%, it was eliminated.

Finally, face validity has been investigated to assess whether the instrument has validity for end-users, namely MS patients. To this purpose, 80 PwMS were asked to identify the items they thought are the most important for them, and grade their importance on a 5-point Likert scale including very important, important, relatively important, slightly important, and unimportant. The percentage of patients who scored 4 or 5 (frequency), and the mean importance score of each item (importance) were calculated and the item impact score of instrument items was computed by the following formula: Item Impact Score (IIS) = frequency × Importance. Items were maintained for  $IIS \geq 1.5$ , corresponding to a mean frequency of 50% and an importance mean of 3 on the 5-point Likert scale.

## CONCLUSIONS

The engagement process (including diaries, focus groups and interviews) corroborated the importance to investigate mood regulation in MS and, at the same time, evaluate the resilience mechanisms put in place by PwMS to face the issues related to mood status. A new PRO on mood and resilience has been co-created by PwMS for PwMS, allowing to include relevant domains in the questionnaire following a scientific process (i.e., the MULTI-ACT guidelines). The lexical expressions have been developed and validated by PwMS, in collaboration with expert clinicians, researchers and caregivers in order to maximize clarity, meet the end-users' expectations, and increase future adherence.

Further research will be required to assess the psychometric properties of the new questionnaire with appropriate statistical analyses.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pedullà L, Bozzoli F, Molinari F, Podda J, Falautano M, Confalonieri P, Korn D, Battaglia MA, Grafigna G, Ponzio M, Bricchetto G, Zarin P. How to measure the impact of mood on people with MS' daily life? A multi-stakeholder approach to co-create a new patient reported outcome. RIMS 2021, virtual edition. Contribution received the Best Platform Presentation Award
- Pedullà L, Bozzoli F, Molinari F, Podda J, Falautano M, Confalonieri P, Korn D, Battaglia MA, Ponzio M, Bricchetto G, Zarin P. Co-creating new patient-reported outcomes through the science with and of patient input: characterization of mood status in people with multiple sclerosis. ECTRIMS 2021, virtual edition
- Pedulla L, Bozzoli F. Science of Patient Input in Progressive MS. Measuring impact on outcome that matter to patients. FISM Annual Congress 2020

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 60.000 €**  
FISM Research special project funded in 2019 and the amount of € 60,000

# Allestimento italiano del programma “REsilience and Activity every DaY for MS”, degli outcomes, e valutazione pilota di efficacia mediante impiego di metodologia mista (READY- It-MS)



## Ambra Mara Giovannetti

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

*Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

*School of Psychology, Faculty of Health and Behavioural Sciences, University of Queensland, Brisbane QLD, Australia*

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Alessandra Solari, Andrea Giordano**, *Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

**Paolo Confalonieri, Rui Quintas**, *Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

**Milda Cerniauskaite**, *Dipartimento Gestionale di Ricerca e Sviluppo Clinico, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

**Kenneth Pakenham, School of Psychology**, *Faculty of Health and Behavioural Sciences, University of Queensland, Brisbane QLD, Australia*

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Irene Tramacere**, *Dipartimento di Ricerca e Sviluppo Clinico, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

**Michele Messmer Uccelli**, *Associazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia*

### COLLABORATORI STUDIO MULTICENTRICO READY / COLLABORATORS OF THE READY MULTICENTER STUDY

Multi\_READY for MS Trial Steering Committee:

**Ambra Mara Giovannetti, Alessandra Solari, Kenneth Ian Pakenham, Giovambattista Presti**, *Kore University Behavioral Lab, Faculty of Human and Social Sciences, Università degli Studi di Enna, Enna, Italia*

**Paola Kruger**, *Patient Expert, EUPATI Fellow, European Patients Academy for Therapeutic Innovation, Roma, Italia*

Independent Data and Safety Monitoring Committee:

**Stefan Gold**, *1. Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose (INIMS), Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany; 2. Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany; 3. Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik m.S. Psychosomatik, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany*

**Marta Bassi**, *Department of Biomedical and Clinical Sciences L. Sacco, Università di Milano, Italia*

**Maria Pia Sormani**, *Biostatistics Unit, Department of Health Sciences, University of Genoa, Italia*





*Data Management and Analysis Committee: Massimo Copetti (Unit of Biostatistics, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italia)*

**Andrea Giordano, Ambra Mara Giovannetti, Alessandra Solari**

Clinical Psychology Expert Panel:

**Ambra Mara Giovannetti, Kenneth Ian Pakenham, Giovambattista Presti,**

**Jana Pöttgen, Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose (INIMS), Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany**

Centri arruolanti:

- *Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unit of Neuroimmunology and Neuromuscular Diseases, Multiple Sclerosis Centre, Milano, Italia: Paolo Confalonieri, Rui Quintas, Milda Černiauskaite*
- *San Camillo-Forlanini Hospital, Roma: Carla Tortorella, Maria Esmeralda Quartuccio, Iaria Rossi*
- *AISM Rehabilitation Service of Genoa, Italian Multiple Sclerosis Society, Genova, Italia: Giampaolo Bricchetto, Miranda Giuntoli, Annalisa Garaventa*
- *Neurology Clinic, Multiple Sclerosis Centre, University Hospital Policlinico Vittorio Emanuele, Catania, Italia: Francesco Patti, Francesca Mongelli, Eleonora Chisari*
- *Laboratorio di neuropsicologia, UOSD psicologia clinica e UOC neurologia, ASST Lariana, Como, Italia: Monica Grobberio, Samuela Turati*
- *Centro Sclerosi Multipla, Divisione di Neurologia Generale, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino di Pavia, Italia: Roberto Bergamaschi, Ambrogia Ornella Riolo, Marta Picascia*
- *Dipartimento Riabilitazione ASL Umbria2, terni, Italia: Mary Micheli, Valentina Schiarelli*
- *Centro Malattie Demielinizzanti e Laboratori di Neurologia Sperimentale, Clinica Neurologica, Università di Perugia, Italia: Massimiliano Di Filippo, Giuliana Costantini, Luciana Ciaccassassi*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il processo di adattamento alla sclerosi multipla (SM) può essere impegnativo e la malattia può rappresentare un'importante fonte di stress. La resilienza è una risorsa interna che ci permette di alleviare gli effetti avversi dello stress e mantenere un buon livello di salute mentale mentre affrontiamo le avversità. Interventi in grado di rinforzare la resilienza in persone con SM sono quindi fondamentali.

Pakenham e colleghi, Università del Queensland, hanno creato un breve intervento di gruppo per promuovere la resilienza, The REsilience and Activities for every DaY (READY), e sviluppato una versione specifica per persone con SM (READY for MS). Il programma si basa sull'Acceptance and Commitment Therapy (ACT) e ha dato prova di essere efficace nel migliorare il funzionamento psicologico in persone con SM. Purtroppo, è raro che interventi psicologici scientificamente supportati siano adeguatamente disseminati e integrati nei servizi nel lungo termine. Un modo per contrastare questa tendenza è quello di formare al loro utilizzo gli operatori dislocati nei servizi territoriali, con la potenzialità non soltanto di arricchire le loro competenze professionali, ma anche di promuovere il loro benessere. Il progetto READY-It-MS valuta l'efficacia del programma READY for MS in Italia (Studio 1 e 3, 4) e l'effetto del training sugli operatori (Studio 2).

## RISULTATI

Lo Studio 1 è uno studio pilota randomizzato controllato che valuta la fattibilità e l'efficacia della versione italiana del programma READY for MS, confrontandolo con un intervento di controllo attivo (rilassamento). Trentasette persone con SM sono state assegnate casualmente a uno dei due interventi (1:1 ratio). La maggior parte dei partecipanti (indipendentemente dal tipo di intervento a cui sono stati assegnati) hanno riportato miglioramenti significativi ( $p < 0.01$ ) nella qualità di vita (QoL), nel tono dell'umore, nella resilienza e nella flessibilità psicologica. Il 65% ha avuto un miglioramento clinicamente rilevante nella qualità della vita (QoL) a tre mesi dalla fine del programma.

La maggior parte dei partecipanti ha mostrato un ottimo livello di coinvolgimento e aderenza al programma. Tutti i partecipanti hanno dichiarato che il programma READY for MS ha migliorato la loro resilienza, avuto un effetto positivo sulla loro vita, permesso loro di affrontare meglio la SM. Tutti i partecipanti raccomanderebbero il programma READY for MS a altre persone con SM, alcuni suggeriscono di estenderlo ad altre condizioni di salute e ai familiari.

A livello quantitativo però, il programma READY for MS non è risultato più efficace del rilassamento. Questo risultato è in contrasto con i dati qualitativi che dimostrano la sua superiorità rispetto al rilassamento per l'impatto sulla vita quo-

tidiana, la quantità di strategie che fornisce e l'interesse che suscita. È possibile che i dati quantitativi non siano risultati significativi per via della bassa numerosità del campione.

Lo Studio 2 è uno studio longitudinale con un singolo intervento, che valuta l'"effectiveness" di un training per formare gli psicologi della rete AISM alla conduzione di gruppi READY for MS. Il training comprende tre fasi: 1) un workshop; 2) la partecipazione a un gruppo READY; 3) la conduzione di un gruppo READY con persone con SM. Le valutazioni sono state effettuate prima del training, prima della partecipazione al gruppo READY, immediatamente dopo e a tre e 15 mesi dalla fine del gruppo READY rivolto agli psicologi. Quarantaquattro psicologi hanno partecipato e completato con successo le prime due fasi del training, 40 hanno condotto il gruppo con persone con SM. I partecipanti hanno riportato miglioramenti in tutte le misure di esito: resilienza, benessere, tono dell'umore e flessibilità psicologica ( $p < 0.001$ ). I miglioramenti sono emersi subito dopo la partecipazione al gruppo READY a loro dedicato e si sono mantenuti a tre e a 15 mesi dalla fine del gruppo. La flessibilità psicologica media questi miglioramenti. Tutti i partecipanti hanno superato con successo l'esame sulle competenze e si sono detti estremamente soddisfatti dell'esperienza.

Lo Studio 3 valuta l'effectiveness del programma READY for MS quando condotto nei normali servizi territoriali (Sezione AISM o Centro SM).

Le persone con SM che hanno preso parte al gruppo hanno compilato un set di questionari al basale, subito dopo l'intervento e a tre mesi. Sono stati condotti 33 gruppi (237 partecipanti). I partecipanti hanno mostrato miglioramenti significativi nel livello di resilienza (outcome primario), ansia, depressione, stress, QoL e flessibilità psicologica. I miglioramenti sono avvenuti principalmente immediatamente al termine del gruppo READY e si sono mantenuti a tre mesi, indipendentemente da caratteristiche demografiche o di malattia. La flessibilità psicologica è risultata mediare i miglioramenti in tutte le variabili di outcome. I dati qualitativi hanno confermato la fattibilità dell'intervento e l'efficacia del programma.

I risultati dei tre precedenti studi sono stati discussi in due

riunioni dedicate (gennaio 2020); le riflessioni emerse hanno contribuito alla definizione del protocollo dello studio multicentrico randomizzato controllato (Studio 4). Lo studio ha subito un ritardo a causa della pandemia da Covid-19 e alla conseguente impossibilità di condurre gruppi in presenza. A febbraio 2022 il Centro SM Besta ha avviato i primi due gruppi dando così l'avvio ufficiale allo studio. Ci aspettiamo che nel corso dei prossimi mesi tutti i centri coinvolti saranno nelle condizioni di partire con l'arruolamento e la conduzione dei gruppi.

## CONCLUSIONI

Il programma READY for MS è stato in grado di migliorare resilienza, ansia, depressione, stress e flessibilità psicologica nei partecipanti, indipendentemente da caratteristiche demografiche o di malattia dei partecipanti. Questo risultato è particolarmente prezioso perché evidenzia come il programma sia estremamente inclusivo e di facile implementazione. A riprova di questo i risultati dello studio 2 e 3 mostrano come il programma READY for MS sia facilmente implementabile nei servizi territoriali italiani dedicati alle persone con SM, indipendentemente dall'area geografica o dalla grandezza del Centro/Sezione AISM. Inoltre, i risultati dello Studio 2 suggeriscono che il training rivolto agli psicologi abbia avuto un impatto positivo, sia a livello professionale che personale con un mantenimento dei benefici a lungo termine. Lo studio multicentrico in corso chiarirà definitivamente se, come indicato dai dati qualitativi dello studio pilota (studio 1), il programma READY for MS sia superiore a altri interventi standard come il training autogeno.

In conclusione questo progetto ha permesso di testare l'efficacia e "effectiveness" del programma READY for MS, di formare decine di colleghi nella conduzione di questi gruppi e di offrire altrettanti gruppi READY for MS a persone con SM seguite nei Centri SM o Sezioni AISM in Italia, rivelandosi un programma efficace e inclusivo. AISM ha anche firmato un accordo con l'Università del Queensland per continuare a offrire questi gruppi alle persone con SM afferenti alle proprie sezioni.

# Italian set up of the program "REsilience and Activity every DaY for MS", of outcomes, and pilot assessment of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)

## INTRODUCTION AND AIMS

Adjusting to multiple sclerosis (MS) can be highly demanding, and the disease can be a consistent source of stress. Resilience is an internal resource for alleviating the adverse effects of stress and sustaining good mental he-

alth through adversity. Therefore, targeted interventions aimed at fostering resilience are crucial in helping people with MS deal with their illness-related stressors and improve their quality of life (QoL).

Pakenham and colleagues - University of Queensland -

developed a brief resilience group intervention called “The REsilience and Activities for every DaY” (READY) and they adapted it to people with MS (READY for MS). READY is an Acceptance and Commitment (ACT)-based group intervention able to improve resilience, QoL, depression, stress and psychological flexibility in people with MS.

Unfortunately, empirically supported psychological interventions are often not adequately disseminated and are seldom integrated into frontline services in the longer term. One way to optimize the uptake of such interventions is to train relevant health professionals in their delivery, with also personal benefits for the trainees (e.g. increased psychological flexibility).

The READY-It-MS project consists of four studies, which address two broad aims: 1. to evaluate READY for MS in Italy (Studies 1, 3 and 4); 2. to evaluate a READY for MS health practitioner training program (Study 2).

## RESULTS

Study 1 was a pilot randomized controlled trial to assess Italian READY for MS efficacy when compared to an active control intervention (group relaxation). Thirty-seven people with MS participated and were randomly allocated to READY for MS or control intervention (1:1 ratio). The whole sample reported significant improvements in several psychological dimensions (QoL, mood, resilience, psychological flexibility,  $p < 0.01$ ) three months after program completion, with 65% reaching a clinically significant improvement in the mental component of QoL (primary outcome).

READY was well accepted by MS patients with varied socio-demographic and clinical characteristics. All READY for MS participants stated that it increased their resilience and positively affected their life, and the majority declared it helped them in dealing better with MS. All participants said that they would recommend the READY for MS program to others with MS, and some suggested it should be offered to people with other medical conditions and carers.

However, READY for MS did not result more efficacious than relaxation at a quantitative level but this was a pilot study, with only the power to detect large differences. Instead, qualitative data provided evidence in favour of READY for MS which was considered more engaging and superior to relaxation in terms of impact on daily life and variety of strategies provided.

Study 2 is a single-arm longitudinal study (with a nested qualitative study) that evaluates the effectiveness of a program for training psychologists in delivering READY for MS. The training encompassed three phases: 1) training workshop; 2) READY participation; 3) READY delivery to people with MS (PwMS). Self-report data were collected immediately before the workshop, before and after the participation in READY, and at three and 15-month follow-ups. Forty-four psychologists successfully completed Phases 1 and 2, 40 Phase 3. Both quantitative and qualitative results showed the training was effective in fostering the acquisition of knowledge and skills for effective delivery of READY to PwMS. Growth curve modelling showed that participants improved over the course of training in resilience, positive affect, wellbeing, psychological flexibility and associated processes. These im-

provements peaked during the participation in READY phase and continued to accrue at a slower rate three months later. Psychological flexibility mediated the improvements in resilience, positive affect and wellbeing. Qualitative data confirmed the personal, professional and community level positive training impacts.

Study 3 aims to evaluate the effectiveness of READY for MS delivered to PwMS via frontline Italian services. This is a single-arm longitudinal study (with a nested qualitative study). Data were collected immediately before the beginning of the program, after the booster session and at 3-months follow-up. Thirty-three READY groups (237 participants) were run. Participants improved in resilience (primary outcome), anxiety, depression, stress, health-related quality of life (HRQoL), and psychological flexibility and associated processes (acceptance, defusion and values). Improvements on most outcomes occurred at post-intervention and were maintained at 3-month follow-up. No demographic or illness variables predicted these improvements. Psychological flexibility mediated improvements in resilience, anxiety, depression, stress, and HRQoL. Qualitative data confirmed READY feasibility and the positive psychological impacts on participants.

Result of the previous studies were discussed in two dedicated meetings (January 2020). The panel discussion informed the design of the multi-centre RCT (Study 4). The multi-centre RCT was paused due to the COVID-19 pandemic and the impossibility to run in-person group intervention. The study officially started on February 2022 when the Besta MS Centre started running the first groups. It is expected that all the centres involved will be able to start the enrolment and running the group in the next few months.

## CONCLUSIONS

The Italian READY for MS is well accepted by PwMS with varied socio-demographic and clinical characteristics. It improves participants' resilience, mood and psychological flexibility. No demographic or illness variables predicted these improvements. This result is particularly important as it indicates that the program is highly accessible and easy to implement in different setting (MS or AISM centre, different geographical areas or centre size). Study 2 results suggested that the training was personally and professionally helpful for the MS psychologists (with long term maintenance of the subjective gains) and the integration of program delivery within patients' association branches and MS Centres was effective.

The multicentre RCT will provide additional information on the possible superiority of READY for MS over relaxation observed during the pilot study (qualitative data).

In conclusion this project has allowed to reach the following goals: 1) to test the efficacy and effectiveness of the READY for MS; 2) to train dozens of psychologist in successfully running a READY for MS group; 3) to offer hundreds of PwMS from all Italy to participate in a READY for MS group, with great results in terms of effectiveness and accessibility. Moreover, AISM signed a copyright agreement to ensure the ongoing delivering of READY for MS.



## PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

### Publications

- Giovannetti AM, Quintas R, Tramacere I, Giordano A, Confalonieri P, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham KI. A resilience group training program for people with multiple sclerosis: Results of a pilot single-blind randomized controlled trial and nested qualitative study. *PLoS One*. 2020 Apr 9;15(4):e0231380. doi: 10.1371/journal.pone.0231380. eCollection 2020
  - Giovannetti AM, Solari A, Pakenham KI. Effectiveness of a group resilience intervention for people with multiple sclerosis delivered via frontline services. *Disabil Rehabil*. 2022 Feb 1:1-13. doi: 10.1080/09638288.2022.2025926
  - Giovannetti AM, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham KI. Evaluation of a program for training psychologists in an acceptance and commitment therapy resilience intervention for people with multiple sclerosis: a single-arm longitudinal design with a nested qualitative study. *Disability and rehabilitation, 1-13*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/09638288.2022.2025926>
- ### Manuscript under review
- Giovannetti AM, Pakenham KI, Presti G, Quartuccio ME, Confalonieri P, Bergamaschi R, Grobberio M, Di Filippo M, Micheli M, Bricchetto G, Patti F, Copetti M, Kruger P, Solari A. A group resilience training program for people with multiple sclerosis: study protocol of a multi-centre cluster-randomized controlled trial (Multi-READY for MS). Under revision in *PLoS one*
- ### Conference abstracts published in international peer reviewed journals
- Giovannetti AM, Quintas R, Giordano A, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham K. (2018). READY for MS, a group intervention to promote resilience in people with multiple sclerosis: a single blind RCT with a nested qualitative study. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(6), 853-853
  - Giovannetti AM, Quintas R, Matarozzi K, Giordano A, Solari A, Pakenham, K. (2018). Individualized quality of life in people with MS: advantages of using the SEIQOL-DW. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(6), 848-848
- ### Conference oral presentations
- Giovannetti AM, Quintas R, Giordano A, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham, K. Progetto READY per pazienti con sclerosi multipla (MS): protocollo e dati preliminari dello studio. (2018). Oral presentation at the "GIS ACT for HEALTH", Italian conference, Rome, March 25th
  - Giovannetti AM, Solari A, Quintas R, Giordano A, Tramacere I, Messmer Uccelli M, Pakenham K. (2018). Pilot mixed method study protocol for evaluating the efficacy of the Italian version of a resilience training program (READY-It-MS). Poster presentation at the Annual Scientific Congress Italian MS Society and its Foundation Rome, May 28 - 30 th 2018
  - Giovannetti AM. The READY It MS project": uno studio multicentrico per promuovere il benessere di persone con sclerosi multipla. Oral presentation at the 9th Annual Conference of the "RETE PSICOLOGI AISM" Rome, Italy, October 18-19th 2018
  - Giovannetti AM. The Italian READY for MS project: from a pilot to a multi-centre RCT. Improving resilience in people with MS. Oral presentation at The Multiple Sclerosis International Federation (MSIF) World Conference, Rome, Italy, October 24-26th 2018
  - Giovannetti AM. The Italian READY for MS project: Improving resilience in people with MS. Oral presentation at the 2nd Annual Conference of the Italian Congress of third wave therapies, Milan, Italy, November 14-16th 2018
  - Giovannetti AM, Quintas R, Tramacere I, Giordano A, Confalonieri P, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham K. Single-blinded, mixed methods, randomized controlled trial on a resilience training for people with MS. Oral presentation at the ACBS World Conference 17 - Dublin, Ireland, June 25-30th 2019
  - Giovannetti AM, Quintas R, Tramacere I, Giordano A, Confalonieri P, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham K. Single-blinded, mixed methods, randomized controlled trial on a resilience training for people with MS. Oral presentation at the Annual Conference of RIMS 'Crossing the Interface to Explore New Possibilities', Ljubljana, Slovenia, June 20 - 22nd 2019
  - Giovannetti AM. Promoting resilience in people with MS: towards a "values-driven" life. Oral presentation at the 6th Annual Conference of the "Interclinical Symposium on Multiple Sclerosis" - Athens, Greece, October 18-20th 2019
  - Giovannetti AM. Evaluation of Acceptance and Commitment Training for psychologists working with people with multiple sclerosis. Oral presentation was scheduled in June 2020, but the conference was postponed due to the COVID-19 pandemic. I will present it during the RIMS Digital Conference - December 4-5, 2020

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2016 e l'ammontare di 213.000 €**  
FISM research special project funded in 2016 and the amount of 213,000 €

# Un nuovo profilo funzionale per monitorare la progressione della disabilità nella sclerosi multipla (PROMOPRO-MS)



## Giampaolo Brichetto

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Margherita Monti Bragadin, Mario Alberto Battaglia, Michela Ponzio, Ludovico Pedullà, Andrea Tacchino**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Alessandro Verri, Annalisa Barla**, Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica, e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università of Genova, Genova, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è classificata principalmente in tre decorsi di malattia: recidivante remittente (RR), caratterizzato da attacchi definiti di peggioramento della funzione neurologica seguita da periodi di recupero parziali o completi; secondariamente progressiva (SP), che segue il decorso della RR ed è caratterizzato da un progresso più costante; primariamente progressiva (PP), caratterizzato da costante peggioramento della funzione neurologica fin dall'esordio. In particolare, l'identificazione del punto di transizione tra RR e SP è estremamente complessa, anche se cruciale per migliorare il processo decisionale del piano terapeutico e l'impatto sulle strategie farmacologiche e riabilitative.

Attualmente, le linee guida per la gestione della SM richiedono l'esecuzione di almeno un esame di risonanza magnetica (RM) all'anno, mentre una valutazione meno frequente è richiesta nella fase progressiva della malattia. Infatti, la RM è essenziale nel processo diagnostico e nella valutazione prognostica della malattia. Il pattern di lesioni RM è attualmente integrato nei criteri diagnostici, ma il gap clinico-radiologico non è stato ancora colmato. Nel recente passato, la ricerca in SM si è soffermata sullo studio dei Patient-Centered Outcomes (PCO) per monitorare la progressione delle malattie neurodegenerative e prendere decisioni tempestive. I PCO consistono in questionari e scale cliniche con valori sia ordinali che categorici, somministrati da medici o autosomministrati dal paziente. I PCO sono ampiamente utilizzati per valutare lo stato generale di salute, per aiutare la diagnosi, monitorare il progresso

della malattia e per quantificare la percezione dei pazienti dell'efficacia di una data terapia o procedura.

Il progetto speciale FISM attivo 'PROMOPRO-MS' ha lo scopo di identificare un set di PCO legati a mobilità, fatica, performance cognitive, stato emotivo, continenza vescicale, qualità di vita, validare un profilo funzionale della SM basato su variabili e misure significative per l'SM, migliorare la detezione del decorso di malattia, predire la progressione della malattia e identificare i migliori predittori di malattia.

## RISULTATI

Dal 2013 PROMOPRO-MS costituisce una coorte di persone con SM (PcSM) in continua crescita. Ad oggi, abbiamo eseguito più di 5.000 valutazioni da circa 1.100 pazienti tra quelli seguiti dai Servizi di Riabilitazione dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM) di Genova, Padova, Vicenza. In questa coorte, ogni paziente è valutato ogni quattro mesi attraverso vari PCOs che ricoprono domini significativi per la SM. Il database ottenuto, oltre ai PCO, contiene anche informazioni aggiuntive quali: i) numero di ricadute negli ultimi quattro mesi (NR), ii) il livello educativo espresso in termini di anni totali di educazione (EDU), iii) altezza (A), iv) peso (P) a v) decorso di malattia. Basandosi su questi dati è stato sviluppato un modello temporale predittivo dell'evoluzione della malattia con particolare focalizzazione sulla detezione della transizione da forma RR a forma SP. Il modello è stato sviluppato utilizzando tecniche di machine learning ed è capace di predire il futuro decorso di patologia delle PcSM con un'accuratezza di



circa l'85%, dimostrando al contempo che i PCO possono essere di grande valore come predittori dell'andamento della SM.

## CONCLUSIONI

L'accuratezza di predizione potrebbe essere ulteriormente migliorata raffinando e potenziando il modello con altri dati ottenibili da altri database che raccolgono informazioni sui pazienti come, ad esempio database amministrativi,

di variabili neurofisiologiche e provenienti da monitoraggi continui con dispositivi elettronici. Questo aspetto potrebbe anche aiutare ad espandere gli orizzonti temporali della predizione spostandoli oltre gli attuali quattro mesi. A questo proposito, per migliorare la predizione, è stato intrapreso un percorso di validazione di nuove scale autoriportate. Inoltre, dal punto di vista IT è stato intrapreso un percorso di sviluppo di una APP dedicata per la raccolta dei PCO in forma autonoma.

# A new functional profile to monitor the progression of disability in MS (PROMOPRO-MS)

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is mainly classified into three disease courses: Relapsing-Remitting (RR), characterized by clearly defined attacks of worsening neurologic function followed by partial or complete recovery periods; Secondary-Progressive (SP), that follows after the RR course and is characterized by a steadier progress; Primary-Progressive (PP), characterized by steadily worsening neurologic function from the beginning. In particular, the identification of the transition point when RR converts to SP is extremely challenging, although crucial in order to improve therapeutic options decision-making and impact on pharmacological and rehabilitative strategies.

Nowadays, best practice for MS management requires the performance of at least one Magnetic Resonance Imaging (MRI) examination per year, while a less frequent assessment is required in the progressive phase of the disease. Indeed, MRI is now essential in the diagnostic process and prognostic evaluation of the disease. MRI lesion pattern is currently integrated in the diagnostic criteria, but the clinical-radiological gap has not been filled yet.

In the recent past, researchers explored the potential role of Patient-Centered Outcomes (PCO) to follow the progression of neurodegenerative diseases and to take timely decisions. PCOs comprise self- and physician-administered tests, questionnaires and clinical scales consisting of either ordinal or categorical scaled answers. To date, PCOs are extensively used to assess general health status, to support diagnosis and monitor progress of disease and to quantify the patients' perception of the effectiveness of a given therapy or procedure.

The ongoing FISM special project "A new functional profile to monitor the progression of disability in MS" (PROMOPRO-MS) aims at identifying a set of PCO related to mobility, fatigue, cognitive performances, emotional status, bladder continence, quality of life, validating a

"functional profile" of MS based on meaningful variables and measures, improving the disease course detection, predicting the disease progression and identifying the best disease predictors.

## RESULTS

Since 2013 PROMOPRO-MS constitutes a growing cohort of people with MS (PwMS). To date, we collected more than 5000 evaluations from about 1100 patients among those followed by the Rehabilitation Services of the Italian Multiple Sclerosis Society (AISM) of Genoa, Padua, Vicenza. In this cohort, each patient is evaluated every four months through several PCOs covering meaningful domains for MS. The collected PCO data set comprises additional information such as: i) number of relapses in the last four months (NR), ii) educational level expressed in terms of total years of education (EDU), iii) height (H), iv) weight (W) and v) disease course. Based on this data a predictive temporal model of the disease evolution was developed with particular focus on the detection of the RR to SP transition. The model has been developed by using machine learning techniques and is able to foresee the future disease course of PwMS with an accuracy of about 85%, demonstrating that PCO are valuable to be used as MS disease course predictor.

## CONCLUSIONS

The accuracy of prediction could be furtherly improved refining and empowering the model with other real world data such as administrative data, neuroimaging data and continuous data from sensors. This aspect could also help to expand the temporal horizons of the prediction. For this reason, we started a process to create and validate new PRO in order to improve the prediction algorithm. Moreover, we started a process to develop and release an APP dedicated to self-collection of PRO data.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Bricchetto G, Monti Bragadin M, Fiorini S, Battaglia MA, Konrad G, Ponzio M, Pedullà L, Verri A, Barla A, Tacchino A. *The hidden information in patient-reported outcomes and clinician-assessed outcomes: multiple sclerosis as a proof of concept of a machine learning approach.* *Neurol Sci.* 2020 Feb;41(2):459-462. doi: 10.1007/s10072-019-04093-x. Epub 2019 Oct 28.
- Prada V, Tacchino A, Podda J, Pedullà L, Konrad G, Battaglia MA, Bricchetto G, Monti Bragadin M. *Mam36 and Abilhand as outcome measures of multiple sclerosis hand disability: an observational study.* *Eur J Phys Rehabil Med.* 2020 Dec 11. doi: 10.23736/S1973-9087.20.06446-1. Epub ahead of print. PMID: 33305546.
- Tacchino A, Ponzio M, Pedullà L, Podda J, Bragadin MM, Pedrazzoli E, Konrad G, Battaglia MA, Mokkink L, Bricchetto G. *Italian validation of the Arm Function in Multiple Sclerosis Questionnaire (AMSQ).* *Neurol Sci.* 2020 Nov;41(11):3273-3281. doi: 10.1007/s10072-020-04363-z. Epub 2020 May 12. PMID: 32394274.
- Bricchetto G, Zaratin P. *Measuring outcomes that matter most to people with multiple sclerosis: the role of patient-reported outcomes.* *Curr Opin Neurol.* 2020 Jun;33(3):295-299. doi: 10.1097/WCO.0000000000000821. PMID: 32324704; PMCID: PMC7259382.

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 380.000 €**  
FISM Research special project funded in 2013 and the amount of € 380,000



# Riabilitazione cognitiva dell'attenzione, a domicilio con l'uso del computer, in soggetti con sclerosi multipla ad esordio pediatrico: uno studio pilota multicentrico



## Maria Pia Amato

*Dipartimento di NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Luisa Pasto, Lorenzo Razzolini, Elio Prestipino, Benedetta Goretti, Claudia Niccolai**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Mauro Zaffaroni, Lorena Pippolo, Marco Roscio**, *Centro Studi Sclerosi Multipla, Ospedale di Gallarate, Gallarate (Va), Italia*

**Maria Trojano, Rosa Gemma Viterbo, Marta Simone**, *Dipartimento di Scienze mediche di base, neuroscienze e organi di senso, Università di Bari, Bari, Italia*

**Eleonora Cocco, Giuseppe Fenu**, *Centro SM, Ospedale Binaghi, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Giancarlo Comi, Lucia Moiola, Monica Falautano**, *Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia*

**Giovanni Mancardi**, *Dipartimento di Neuroscience, Università di Genova, Genova, Italia*

**Ruggero Capra**, *Centro Regionale Sclerosi Multipla, Presidio di Montichiari, Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italia*

**Renzo Guerrini, Federico Melani**, *Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze, Firenze, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'esordio della sclerosi multipla (SM) prima dei 18 anni si verifica nel 3-10% della totalità dei pazienti con SM. Circa il 30% dei bambini e adolescenti con SM manifestano deficit cognitivi, in particolare a carico dell'attenzione e della velocità di elaborazione delle informazioni, della memoria, delle funzioni esecutive e delle funzioni visuo-motorie, domini che sono frequentemente colpiti anche nella SM degli adulti. Il linguaggio può essere coinvolto soprattutto nei casi infantili a esordio più precoce. Il deficit cognitivo nella SM pediatrica può avere un profondo impatto negativo sulle attività della vita quotidiana e sul rendimento scolastico, indipendentemente dalla disabilità fisica. Nonostante il crescente interesse della ricerca scientifica in questo campo, nessun intervento specifico (né farmacologico né riabilitativo) si è dimostrato sicuramente efficace nella popolazione di SM pediatrica.

L'obiettivo primario di questo studio multicentrico, randomizzato, controllato in doppio cieco è valutare la fattibilità e preliminarmente l'efficacia di un training computerizzato dell'attenzione, specificatamente sviluppato per questo pro-

posito, in pazienti con SM a esordio pediatrico. Gli obiettivi secondari sono a) la valutazione di eventuali miglioramenti in funzioni cognitive non specificamente incluse nel programma di riabilitazione, b) la valutazione "ecologica" degli effetti del programma sulle attività della vita quotidiana e scolastiche, c) la valutazione dei predittori clinici e demografici di risposta al trattamento, inclusi gli indicatori di riserva cognitiva del soggetto; d) in un sottogruppo di pazienti, lo studio con RM strutturale e funzionale delle modifiche del pattern di attivazione cerebrale e della plasticità strutturale dopo il training, da interpretarsi in combinazione coi risultati neuropsicologici. Dopo una fase preliminare all'avvio dello studio, necessaria per la messa a punto dell'applicazione, il suo test preliminare su un campione limitato di soggetti sani e malati, lo studio prevede una fase di training comune degli operatori coinvolti per standardizzare tra i centri la valutazione neuropsicologica dei soggetti, e le istruzioni da fornire per l'uso dell'applicazione, quindi l'implementazione del trial randomizzato, il follow up dei soggetti, l'analisi e pubblicazione dei risultati.

## RISULTATI

Il training è stato somministrato ad un gruppo di 30 controlli sani (10 Maschi, 20 Femmine con età media di 15,8 anni con deviazione standard di 2,21; età media di scolarizzazione di 12,3 anni con deviazione standard di 1,7), per la messa a punto dell'applicazione (compliance e fattibilità).

Per il gruppo di studio studio sono stati arruolati, e randomizzati, 30 bambini e adolescenti con SM di cui 11 Maschi e 19 Femmine con età media di 14,8 (deviazione standard 3,2) e scolarità media 12,3 (deviazione 2,3).

Ad oggi tutti i centri coinvolti nello studio hanno ottenuto l'approvazione del Comitato etico e completato l'arruolamento. La tabella 1 riassume lo stato di arruolamento.

**TABELLA 1. CENTRI PARTECIPANTI E STATO DELL'ARRUOLAMENTO**

<b>CENTRI PARTECIPANTI</b>	<b>PZ SCREENATI</b>	<b>PZ ARRUOLATI</b>
<i>Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer</i>	5	3
<i>Università degli Studi di Bari</i>	12	12
<i>Spedale Civile di Brescia</i>	11	0
<i>Università degli Studi di Cagliari</i>	9	7
<i>Ospedale San Antonio Abate, Gallarate</i>	3	2
<i>Università degli Studi di Genova</i>	2	1
<i>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano</i>	8	5

# Home-based, computer-assisted cognitive rehabilitation for attention in pediatric onset multiple sclerosis: a pilot multicenter study

## INTRODUCTION AND AIMS

Onset of MS before the age of 18 accounts for 3-10% of the whole MS population. Approximately 30% of children and adolescents with MS experience CI, particularly in the domains of attention and speeded processing, memory, executive functions and visuomotor functions, which are also commonly involved in adult-onset MS (AOMS). Language may be also involved, particularly in POMS with younger age at onset. CI in POMS can have a profound negative impact on patients' lifestyle and school achievements, also independent from physical disability.

Despite the growing interest in the field, so far no specific intervention (neither pharmacological nor rehabilitative) tailored for the needs of the pediatric population has proved to be effective.

The primary aim of this multicentric randomized, double blind, controlled study is to preliminarily evaluate the feasibility and effectiveness of a computer-based training of attention, specifically developed for this purpose. Secondary objectives are a) the evaluation of possible improvements in cognitive functions not specifically included in the rehabilitation program, b) the "ecological" evaluation of the effects of the program on daily and school life activities c) assessment of demographic and clinical predictors of treatment response, including proxies of the subject cognitive reserve; d) in a sub-group of subjects, structural and fMRI analyses of changes in the pattern of brain activations and structural plasticity after the training program, to be interpreted in combination with neuropsychological results.

## RESULTS

The training was administered to a group of 30 healthy controls (10 males, 20 females with a mean age of 15.8 and SD of 2.21; Mean education, years 12.3 and SD of 1,7), for the development of the application (compliance and feasibility). For the study group 30 children and adolescents with MS

were enrolled and randomized: 11 males, 19 females with a mean age of 14.8 (SD of 3.2) and mean education, years 12.4 (SD of 2,3).

To date, all the centers involved in the study have obtained approval from the Ethics Committee and completed enrollment. Table 1 summarizes the enrollment status.

TABLE 1. ENROLLMENT STATUS

PARTECIPATING CENTERS	PT SCREENED	PT ENROLLED
Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer	5	3
Università degli Studi di Bari	12	12
Spedale Civile di Brescia	11	0
Università degli Studi di Cagliari	9	7
Ospedale San Antonio Abate, Gallarate	3	2
Università degli Studi di Genova	2	1
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano	8	5



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Amato MP, Langdon D, Montalban X et al. Treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis: position paper. *J Neurol.* 2013 Jun;260(6):1452-68.
- Amato MP, Krupp LB, Charvet LE, Penner I, Till C. Pediatric multiple sclerosis: Cognition and mood. *Neurology.* 2016 Aug 30;87(9 Suppl 2):S82-7.
- Ruano L, Branco M, Portaccio E et al. Patients with paediatric-onset multiple sclerosis are at higher risk of cognitive impairment in adulthood: An Italian collaborative study. *Mult Scler.* 2017 Jun 1.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Cognitive and psychosocial features of childhood and juvenile MS. *Neurology.* 2008 May 13;70(20):1891-7.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Cognitive and psychosocial features in childhood and juvenile MS: two-year follow-up. *Neurology.* 2010 Sep 28;75(13):1134-40.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Neuropsychological features in childhood and juvenile multiple sclerosis: five-year follow-up. *Neurology.* 2014 Oct 14;83(16):1432-8.
- Tacchino A, Pedullà L, Bonzano L et al. A New App for At-Home Cognitive Training: Description and Pilot Testing on Patients with Multiple Sclerosis. *JMIR Mhealth Uhealth.* 2015 Aug 31;3(3):e85.

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 220.000€**  
FISM Research special project funded in 2017 and the amount of € 220,000

# La sinaptopatia infiammatoria come bersaglio dell'esercizio terapeutico nella lotta alla sclerosi multipla



## Diego Centonze

*IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (Is), Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Mario Stampanoni Bassi, Ennio Iezzi, Ilaria Simonelli**, *IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (Is), Italia*

**Luana Gilio**, *IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (Is), Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma, Italia*

**Francesca Romana Rizzo**, *Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma, Italia*

**Antonietta Gentile**, *Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica, IRCCS San Raffaele Pisana, Roma, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune cronica neurodegenerativa del sistema nervoso centrale. Il bersaglio farmacologico nella SM sono i linfociti T, cellule del sistema immunitario, che danno vita alla reazione autoimmune che porta alla neurodegenerazione. Studi clinici e preclinici hanno dimostrato che uno dei meccanismi di morte neuronale nella SM è la cosiddetta sinaptopatia infiammatoria, ovvero un'alterazione della trasmissione nervosa causata dall'infiammazione che avviene in maniera precoce in aree cerebrali deputate alle funzioni cognitive e del controllo motorio ed emozionale. La sinaptopatia infiammatoria porta a neurodegenerazione, ma, essendo un fenomeno reversibile, rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico. Modelli chimerici di incubazione di linfociti T di pazienti SM con neuroni murini hanno messo in evidenza che i linfociti T causano sinaptopatia infiammatoria, rivelando così l'importanza di terapie che interferiscano con l'asse immuno-sinaptico. Il trattamento della SM oggi include non solo terapie farmacologiche ma anche riabilitative. L'esercizio fisico si è dimostrato in grado di apportare grossi benefici ai pazienti SM, migliorando la qualità della vita e alcuni deficit clinici, come la capacità motoria e le funzioni cognitive. Ciononostante, l'impatto dell'esercizio sulla malattia, ovvero la capacità di modificarne il decorso clinico, e sui meccanismi di sinaptotossicità non sono ancora chiari. L'ipotesi di questo studio è che l'eserci-

zio fisico, abbassando i livelli delle molecole infiammatorie rilasciate dai linfociti T, possa interferire con i meccanismi di tossicità innescati dall'infiammazione sulla trasmissione sinaptica nel cervello di pazienti SM, contribuendo al recupero motorio e cognitivo.

Il presente progetto si basa su uno studio longitudinale di pazienti SM che valuta se l'esercizio fisico sia in grado di contrastare la sinaptopatia infiammatoria e di favorire fenomeni di neuroprotezione e ripresa funzionale. In questi pazienti è stato valutato all'inizio (t0), al termine (t1) e dopo un periodo di follow up (t2) l'impatto dell'esercizio fisico sulla disabilità motoria, l'umore, la plasticità sinaptica e l'attività corticale e i livelli di TNF e IL-1beta rilasciati dai linfociti T isolati dal sangue periferico. Inoltre, sfruttando il modello chimerico di incubazione di linfociti T di pazienti SM su fettine cerebrali di topo è stato valutato l'effetto dell'esercizio stesso sull'infiammazione e sulla sinaptopatia infiammatoria indotta dai linfociti T.

## RISULTATI

A causa dell'emergenza sanitaria causata dalla pandemia da Covid-19, sono stati reclutati solo 21 pazienti dei 30 previsti. Di questi, 16 hanno completato le valutazioni al t1, e 10 pazienti hanno completato lo studio fino alle valutazioni di follow-up al t2. Tutti i pazienti reclutati, che hanno mostrato elevata compliance allo studio, sono stati sottoposti ad un programma riabilitativo di 3 ore/giorno,

6 sedute/settimana per 4 settimane. A causa della ridotta dimensione del campione, l'analisi statistica di tutti i parametri è stata limitata.

Non ci sono stati effetti significativi del programma riabilitativo sulle scale di disabilità motoria e sul 25-Foot Walk Test, un test fortemente correlato con la progressione di malattia. Al contrario, la manualità e la funzionalità dell'arto superiore dominante (9-HOLE) mostrano un significativo miglioramento nella performance a t1 rispetto a t0. I dati indicano che l'esercizio ha un effetto benefico significativo sull'ansia valutata dallo State-Trait Anxiety Inventory form Y. Inoltre, l'esercizio migliora la qualità complessiva della vita valutata attraverso la batteria di test del Multiple Sclerosis Quality of Life (MSqoL) nelle componenti fisiche e di energia e relative alla fatica fisica percepita. È stata registrata anche una riduzione quasi significativa dei sintomi depressivi al Beck Depression Inventory test.

Infine, la riabilitazione migliora gli effetti percepiti della SM sulla vita quotidiana e sui sintomi della malattia da un punto di vista psicologico, secondo la Multiple Sclerosis Impact Scale. In un sottogruppo di 9 pazienti che non avevano controindicazioni, abbiamo valutato la plasticità sinaptica mediante stimolazione magnetica transcranica (TMS). Confrontando gli effetti del protocollo PAS, è stata osservata una migliore risposta nei pazienti dopo la riabilitazione sebbene non siano state osservate differenze significative.

L'analisi della concentrazione di TNF e IL1-beta rilasciati dai linfociti T ai diversi time-points non hanno rilevato variazioni significative tra t0 e t1, confermando tuttavia l'aumento di alcune citochine proinfiammatorie nei pazienti con SM Progressiva (SMP) rispetto a soggetti sani. Lo studio sul modello chimerico ha mostrato un'esacerbazione della trasmissione glutamatergica striatale mediata dai linfociti T prelevati da soggetti con SMP e una tendenza alla correzione di tali difetti dopo esercizio fisico. Al contrario, esperimenti di plasticità sinaptica ippocampale non hanno evidenziato alterazioni significative nei diversi gruppi sperimentali.

## CONCLUSIONI

Sebbene non conclusivi, a causa della piccola dimensione del campione, i dati raccolti in questo studio suggeriscono che la riabilitazione migliora significativamente la qualità della vita nella SM con effetti benefici sui disturbi dell'umore e sull'ansia. I dati di TMS hanno confermato la compromissione della plasticità nei pazienti con SM progressiva ed è stata osservata una migliore risposta al protocollo PAS dopo la riabilitazione. Un simile effetto benefico dell'esercizio si osserva sull'azione sinaptotossica dei linfociti T sulla trasmissione glutamatergica nel modello chimerico, sebbene i livelli dei principali fattori di danno sinaptico nella SM, TNF e IL1-beta rilasciati dai linfociti T risultino significativamente modificati dall'esercizio.

# The inflammatory synaptopathy as a target of exercise therapy in the fight against multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neurodegenerative autoimmune disease of the central nervous system. The pharmacological target in MS are T lymphocytes, cells of the immune system, which give rise to the autoimmune reaction that leads to neurodegeneration. Clinical and preclinical studies have shown that one of the mechanisms of neuronal death in MS is the so-called inflammatory synaptopathy, an alteration of the synaptic transmission caused by inflammation that occurs early in the brain areas responsible for cognitive, motor functions and emotional control. The inflammatory synaptopathy leads to neurodegeneration, but being a reversible phenomenon, it represents a potential therapeutical target. A chimeric model of incubation of T cells of MS patients with mouse neurons has highlighted that T cells cause inflammatory synaptopathy, thus revealing the relevance of therapies that interfere with the immune-synaptic axis. MS treatment includes

pharmacological and rehabilitative therapies. It has been demonstrated that exercise has beneficial effects in MS patients, improving the quality of life and clinical outcome, such as motor and cognitive functions. Nonetheless, the impact of the exercise on the disease, or its ability to modify the clinical course, and the mechanisms of synaptotoxicity are still unclear.

The hypothesis of this study is that exercise, by lowering the levels of inflammatory molecules released by T cells, may interfere with the mechanisms of toxicity triggered by inflammation on the synaptic transmission in the brain of MS patients, contributing to motor and cognitive recovery. This project is a longitudinal study of MS patients to assess whether physical exercise is able to counteract inflammatory synaptopathy, thus promoting neuroprotection and functional recovery. The impact of exercise will be evaluated on several clinical outcomes, including motor disability, mood, neurophysiological parameters and the levels of

pro-inflammatory cytokines IL1-beta and TNF released by T lymphocytes isolated from peripheral blood of MS patients at the beginning (t0) and at the end of rehabilitative program (t1) and after a follow up period (t2). Furthermore, taking advantage of the chimeric model of incubation of MS patients T cells on cerebral mouse slices, we evaluated the effects of exercise on inflammation and inflammatory synaptopathy induced by T lymphocytes.

## RESULTS

Due to the healthcare emergency caused by the COVID-19 outbreak, only 21 patients out of the foreseen 30 were recruited. Of these, 16 patients completed the assessments at t1 and 10 patients underwent both t1 and t2 evaluations. All recruited patients, who showed high compliance with the study, underwent a 3-hour/day rehabilitation program, 6 sessions/week for 4 weeks. There were no significant effects of the rehabilitation program on the motor disability scales of the EDSS and on the 25-Foot Walk Test, which is strongly correlated with disease progression. On the contrary, the manual dexterity and functionality of the dominant upper limb (9-HOLE) shows a significant improvement in performance at t1 compared to t0. Data indicates that exercise has a significant beneficial effect on trait anxiety evaluated by State-Trait Anxiety Inventory Form Y. Moreover, exercise improves the overall quality of life assessed through the Multiple Sclerosis Quality of Life and in the physical, energy components and the perceived fatigue. We also register an almost significant reduction of depressive symptoms at Beck Depression Inventory test. Finally, rehabilitation improves the perceived effects of SM on daily life and on the disease symptoms from a psychological point of view, according to the Mul-

tipple Sclerosis Impact Scale. In a subgroup of 9 patients who had no contraindications, we assessed LTP-like plasticity by means of transcranial magnetic stimulation (TMS). Comparing the effects of the PAS protocol at baseline and at t1, we observed an enhancement of LTP-like response to the PAS protocol after rehabilitation, although the effect is non-significant.

The analysis of the levels of TNF and IL1-beta released by T cells at the different time-points showed no significant changes between t0 and t1, albeit confirming the increase of some proinflammatory cytokines in MS patients compared to healthy subjects.

The chimeric model showed that T lymphocytes taken from PMS subjects induced the exacerbation of glutamatergic transmission in the striatum and a trend in the reduction of these defects after physical exercise. Conversely, hippocampal synaptic plasticity experiments did not show any statistical difference among the three experimental groups.

## CONCLUSIONS

Although not conclusive, due to the small sample size, data collected in this study suggest that rehabilitation significantly improves quality of life in MS with beneficial effects on mood disorders and anxiety. TMS data confirmed the impairment of LTP-like plasticity in progressive MS patients and a better response to the PAS protocol was observed after rehabilitation. A similar beneficial effect of exercise is observed on the synaptotoxic action of T cells on glutamatergic transmission in the chimeric model, although the T cell-released levels of TNF and IL1-beta, the main drivers of synaptic damage in MS, are not significantly changed by exercise.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- De Vito F, Musella A, Fresegna D, Rizzo FR, Gentile A, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Buttari F, Procaccini C, Colamatteo A, Bullitta S, Guadalupi L, Caioli S, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Bruno A, Dolcetti E, Furlan R, Finardi A, Licursi V, Drulovic J, Pekmezovic T, Fusco C, Bruzzaniti S, Hornstein E, Uccelli A, Salvetti M, Matarese G, Centonze D, Mandolesi G. MiR-142-3p regulates synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021 Sep 7. doi: 10.1111/nan.12765
- Rizzo FR, Guadalupi L, Sanna K, Vanni V, Fresegna D, De Vito F, Musella A, Caioli S, Balletta S, Bullitta S, Bruno A, Dolcetti E, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Gilio L, Mandolesi G, Centonze D, Gentile A. Exercise protects from hippocampal inflammation and neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2021 Nov;98:13-27. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.212. doi: 10.3390/cells10020330





- Mandolesi G, Rizzo FR, Balletta S, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Guadalupi L, Nencini M, Moscatelli A, Ryan CP, Licursi V, Dolcetti E, Musella A, Gentile A, Fresegna D, Bullitta S, Caioli S, Vanni V, Sanna K, Bruno A, Buttari F, Castelli C, Presutti C, De Santa F, Finardi A, Furlan R, Centonze D, De Vito F. The microRNA let-7b-5p Is Negatively Associated with Inflammation and Disease Severity in Multiple Sclerosis Cells. 2021 Feb 5;10(2):330. doi: 10.3390/cells10020330
- Stampanoni Bassi M, Drulovic J, Pekmezovic T, Iezzi E, Sica F, Gilio L, Gentile A, Musella A, Mandolesi G, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Bellantonio P, Fantozzi R, Centonze D, Buttari F. Cerebrospinal fluid inflammatory biomarkers predicting interferon-beta response in MS patients. *Ther Adv Neurol Disord.* 2020 Dec 8;13:1756286420970833. doi: 10.1177/1756286420970833
- Fresegna D, Bullitta S, Musella A, Rizzo FR, De Vito F, Guadalupi L, Caioli S, Balletta S, Sanna K, Dolcetti E, Vanni V, Bruno A, Buttari F, Stampanoni Bassi M, Mandolesi G, Centonze D, Gentile A. Cells. Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy. 2020 Oct 14;9(10):2290. doi: 10.3390/cells9102290
- Dolcetti E, Bruno A, Guadalupi L, Rizzo FR, Musella A, Gentile A, De Vito F, Caioli S, Bullitta S, Fresegna D, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Buttari F, Stampanoni Bassi M, Centonze D, Mandolesi G. Emerging Role of Extracellular Vesicles in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 4;21(19):7336. doi: 10.3390/ijms21197336
- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Nicoletti CG, Mori F, Gilio L, Simonelli I, De Paolis N, Marfia GA, Furlan R, Finardi A, Centonze D, Iezzi E. Interleukin-1 $\beta$  Alters Hebbian Synaptic Plasticity in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 23;21(19):6982. doi: 10.3390/ijms21196982. doi: 10.3390/ijms21196982
- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Gilio L, De Paolis N, Fresegna D, Centonze D, Iezzi E. Inflammation and Corticospinal Functioning in Multiple Sclerosis: A TMS Perspective. *Front Neurol.* 2020 Jul 7;11:566. doi: 10.3389/fneur.2020.00566. eCollection 2020
- Bruno A, Dolcetti E, Rizzo FR, Fresegna D, Musella A, Gentile A, De Vito F, Caioli S, Guadalupi L, Bullitta S, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Buttari F, Stampanoni Bassi M, Centonze D, Mandolesi G. Inflammation-Associated Synaptic Alterations as Shared Threads in Depression and Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2020 Jun 23;14:169. doi: 10.3389/fncel.2020.00169. eCollection 2020
- Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Drulovic J, Pekmezovic T, Gilio L, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Sica F, Centonze D, Buttari F. IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2020 Jun 23;14:120. doi: 10.3389/fncel.2020.00120. eCollection 2020
- Musella A, Gentile A, Guadalupi L, Rizzo FR, De Vito F, Fresegna D, Bruno A, Dolcetti E, Vanni V, Vitiello L, Bullitta S, Sanna K, Caioli S, Balletta S, Nencini M, Buttari F, Stampanoni Bassi M, Centonze D, Mandolesi G. Cells. Central Modulation of Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Ameliorates Experimental Multiple Sclerosis. 2020 May 22;9(5):1290. doi: 10.3390/cells9051290
- Musella A, Fresegna D, Rizzo FR, Gentile A, De Vito F, Caioli S, Guadalupi L, Bruno A, Dolcetti E, Buttari F, Bullitta S, Vanni V, Centonze D, Mandolesi G. 'Prototypical' proinflammatory cytokine (IL-1) in multiple sclerosis: role in pathogenesis and therapeutic targeting. *Expert Opin Ther Targets.* 2020 Jan
- Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Pavone L, Mandolesi G, Musella A, Gentile A, Gilio L, Centonze D, Buttari F. Modeling Resilience to Damage in Multiple Sclerosis: Plasticity Meets Connectivity. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec
- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Maffei P, De Paolis N, Sancesario A, Gilio L, Pavone L, Pasqua G, Simonelli I, Sica F, Fantozzi R, Bellantonio P, Centonze D, Iezzi E. Practice-dependent motor cortex plasticity is reduced in non-disabled multiple sclerosis patients. *Clin Neurophysiol.* 2020 Feb
- Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Gilio L, Centonze D, Buttari F. Synaptic Plasticity Shapes Brain Connectivity: Implications for Network Topology *Int J Mol Sci.* 2019 Dec
- Gentile A, Musella A, De Vito F, Rizzo FR, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, Guadalupi L, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Centonze D, Mandolesi G. Immunomodulatory Effects of Exercise in Experimental Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019 Sep
- Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Mori F, Simonelli I, Gilio L, Buttari F, Sica F, De Paolis N, Mandolesi G, Musella A, De Vito F, Dolcetti E, Bruno A, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Centonze D, Rizzo FR. Interleukin-6 Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Tissue Damage Compensation in Multiple Sclerosis. *Neurorehabil Neural Repair.* 2019 Aug
- Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Buttari F, Gilio L, Simonelli I, Carbone F, Micillo T, De Rosa V, Sica F, Furlan R, Finardi A, Fantozzi R, Storto M, Bellantonio P, Pirolo P, Di Lemme S, Musella A, Mandolesi G, Centonze D, Matarese G. Obesity worsens central inflammation and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2019 Jun

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2018 e l'ammontare di 84.215,22 €**

FISM Research special project funded in in 2018 and the amount of € 84,215.22



# Studio di ricerca sulla percezione di competenza delle persone che si prendono cura o assistono un familiare con la sclerosi multipla



**Michela Ponzio**

Area Ricerca Scientifica, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), Genova, Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Jessica Podda, Andrea Tacchino, Anna Verri**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Molte persone con sclerosi multipla (SM), soprattutto con disabilità più avanzata, possono richiedere un supporto emotivo, fisico e pratico per gestire le sfide quotidiane e per mantenere l'autonomia. L'assistenza e il supporto ricadono principalmente su un membro della famiglia, identificato come caregiver. Il 30% delle persone con SM a causa della disabilità ha bisogno di un'assistenza continua nelle attività quotidiane, che nell'80% dei casi è fornita dai caregiver familiari. Il ruolo del caregiver è ricoperto in più della metà dei casi dal compagno o compagna e nel 25% dai figli o genitori. La quantità di tempo dedicata all'assistenza e le restrizioni alla vita personale sono fattori che aumentano il "peso" psicologico, sociale, fisico ed economico del caregiver.

Gli obiettivi dello studio sono di valutare la percezione di competenza delle persone che si prendono cura o assistono un familiare con SM e di identificare i fattori che possono modificare la loro percezione. Lo studio sarà condotto in tre fasi. La prima fase consisterà nello sviluppo e la validazione della scala Caregiver MS Knowledge (CareKoMS) in un campione di caregiver di persone con SM. La seconda fase prevedrà una validazione culturale della scala Sense of Competence Questionnaire in lingua italiana. La terza fase dello studio valuterà la percezione di competenza dei caregiver di un familiare con SM utilizzando la nuova versione italiana del questionario validato in fase 2. Inoltre, la terza fase analizzerà i potenziali fattori che possono modificare la percezione di competenza, tra cui la conoscenza delle SM da parte dei caregiver (validata nella fase 1), il coping, il supporto sociale, la qualità della vita, l'umore, le caratteristiche sociodemografiche e gli aspetti relativi alla persona con SM.

## RISULTATI

La prima fase di sviluppo e validazione della Scala CareKoMS, condotta da agosto 2020 a settembre 2021,

ha previsto due differenti step: 1) sviluppo e 2) valutazione psicometrica dello strumento.

1) Sviluppo dello strumento. Inizialmente, un pool di 52 item a risposta multipla sono stati individuati ad opera di un panel multidisciplinare di esperti che includeva psicologi, fisioterapisti, neurologi, fisiatristi, personale di AISM vicino a pazienti e caregiver, sulla base dell'esistente letteratura e sulle informazioni a disposizione di AISM con l'obiettivo di investigare la conoscenza che i caregiver avessero sulla malattia del loro familiare con SM. Successivamente, il panel di esperti ha realizzato una versione a 32 item sulla base di una loro revisione e dei feedback ottenuti a seguito di due focus group condotti con alcuni caregiver di persone con SM.

2) Valutazione psicometrica dello strumento. I 32 item di cui era composta la versione preliminare dello strumento ricoprivano i 6 ambiti più rilevanti della SM (eziopatogenesi, incidenza, diagnosi, decorso, sintomi, terapia). 200 caregiver reclutati da psicologi esperti in SM appartenenti al network italiano "Rete Psicologi AISM" ha risposto alla versione a 32 item della scala. Un'analisi psicometrica è stata implementata al fine di eliminare gli item con scarse proprietà psicometriche. L'analisi è stata condotta utilizzando alcuni indicatori come indice di difficoltà degli item, indice di discriminazione degli item, il coefficiente di Kuder-Richardson-20 e la correlazione item-totale. Sulla base dei risultati ottenuti, 11 item sono stati eliminati ottenendo quindi una versione finale a 21 item. Il punteggio medio della scala è di 13.7 ( $DS \pm 3.7$ ); il valore mediano di 14 (RIQ: 11-16), non si registra né un effetto tetto né un effetto pavimento. La distribuzione dei punteggi è risultata asimmetrica e l'ipotesi di assunzione di normalità quindi respinta ( $p=0.042$ ). La consistenza interna della scala 21 item è buona (Kuder-Richardson-20: 0.74). La validità di costruito, analizzata con la tecnica dei gruppi noti, ha evidenziato che i caregiver con un livello più elevato di

istruzione avevano punteggi significativamente più elevati rispetto a quelli con un livello di istruzione inferiore ( $p=0.006$ ) mentre il sesso ( $p=0.422$ ) e l'età ( $p=0.818$ ) non risultavano associati alla performance alla scala.

## CONCLUSIONI

La prima fase dello studio ha realizzato una versione a 21 item della scala CareKoMS. Nel complesso, la scala risulta avere buone proprietà psicometriche e può essere considerata un prezioso strumento in ambito clinico e di ricerca per indagare la conoscenza che i caregiver di pazienti con SM hanno nei confronti di questa malattia neurodegenerativa.

# A study of the sense of competence in family caregivers of people with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Many people with multiple sclerosis (MS), especially those individuals with moderate to severe disability, require emotional, physical and practical support to manage the challenges of daily life and to maintain independence. Providing this on-going support falls primarily on family members, often referred to as caregivers, who provide as much as 80% of home care to individuals with MS.

Distinctive characteristics of MS can influence the caregiving experience, including the fact that the onset is most often in young adulthood, it is a degenerative illness, there is currently no definitive cure, the disease course is variable, acute exacerbations can occur unpredictably and clinical symptoms vary.

The overall aim of the study is to evaluate the sense of competence in family caregivers of individuals with MS and to determine potentially influencing factors. The study will be carried out in three steps.

The first step will consist of the development and validation of the Caregiver MS Knowledge (CareKoMS) Questionnaire in a sample of caregivers of people with MS in order to investigate caregivers' knowledge about MS. In the second step, there will be a cross-cultural validation of the family caregiver Sense of Competence Questionnaire into Italian. The third step of the study will assess the sense of competence of family caregivers of individuals with MS using the newly validated Italian version of the Sense of Competence Questionnaire (phase 2). The final phase will assess potential correlating factors including caregivers' knowledge of MS (validated in phase 1), coping, perceived social support, quality of life, mood, sociodemographic variables and care recipient characteristics.

## RESULTS

The first step that consists of the development and validation of the Caregiver MS Knowledge Questionnaire has been carried out between August 2020 and September 2021.

This step was based on two different phases: instrument development and psychometric evaluation.

1) Instrument development. A bank of 52 multiple-choice questions was developed by an expert multidisciplinary panel including psychologists, physical therapists, neurologists, rehabilitation physicians, MS Society staff expert in patient and family information based on available literature and caregiver-targeted information materials produced by the MS Society, with the goal of testing caregivers' knowledge of the disease. Subsequently, a preliminary version of instrument of 32 items has been produced by the expert panel considering results of two caregivers' focus groups.

2) Psychometric evaluation. A preliminary version of 32-item instrument was developed, reflecting 6 themes expressing the most relevant aspects of knowledge of MS based on multidisciplinary expert panel.) and caregivers.

The original 32 items instrument was tested on 200 caregivers enrolled through a national network of psychologists working on MS named "Rete Psicologi AISM" () to eliminate poor performing items. The item analysis using item difficulty index, item discrimination index, Kuder-Richardson-20 coefficient and the item-total correlation were assessed. Based on these results, 11 items were removed obtaining a final version of 21-items. The mean 21-items CareKoMS was 13.7 (SD: 3.7), median 14 (IQR: 11-16), no ceiling or floor effects were registered. Score distribution was skewed, and the normality assumption rejected ( $p=0.042$ ). The internal consistency of the 21 items was good (Kuder-Richardson-20, 0.74). Finally, construct validity was analysed using known groups technique. Group scores of participants with a high educational level were found to be statistically significantly higher than caregivers with lower educational level ( $p=0.006$ ), while sex ( $p=0.422$ ) and age class ( $p=0.818$ ) were not associated with C-MSKQ score.

## CONCLUSIONS

This first step of the study produced a 32-items CareKoMS.

The instrument demonstrated acceptable psychometric properties and can be applied in both research and practice for evaluating knowledge about disease of caregivers of people with MS.

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 e l'ammontare di 30.000 €**  
FISM Research special project funded in 2020 and the amount of € 30,000

# Il PDTA come strumento di umanizzazione e personalizzazione dei percorsi di cura e assistenziali presso la Rete della SM



## Paolo Bandiera

*Affari Generali e relazioni istituzionali, AISM, Genova Italia*

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Tommaso Manacorda, Giorgia Franzone, Linda Brozzo, Grazia Rocca, Paola Zarin, Giampaolo Brichetto, Gianluca Pedicini**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Matilde Inglese, Gianluigi Mancardi, IRCSS S. Martino, Genova, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La SM causa una amplissima varietà di sintomi, che variano e si evolvono nel tempo in un quadro spesso caratterizzato da un progressivo aggravamento delle condizioni. La SM può portare a distanza di anni dalla diagnosi a limitazioni importanti dell'autonomia e a disabilità. Le persone con SM hanno quindi bisogno nel corso della loro vita di una varietà di servizi sanitari e sociali molto diversi tra loro. Questi spaziano dai consulti con numerosi specialisti diversi dal neurologo (ad esempio urologi, gastroenterologi, ginecologi, etc.) alla terapia riabilitativa e occupazionale, al supporto psicologico, fino ad assistenza personale e domiciliare e ausili, e all'accesso alle misure di protezione sociale e di inclusione sociale e lavorativa.

Nonostante gli importanti investimenti nell'integrazione dei servizi, e i progressi ottenuti nel tempo, i sistemi di cura e di assistenza incontrano ancora difficoltà a garantire che le persone con SM accedano in modo fluido e tempestivo ai servizi diversi di cui hanno bisogno. Il doversi orientare autonomamente tra servizi erogati da articolazioni anche molto lontane tra loro dal punto di vista organizzativo costituisce un onere aggiuntivo per le persone con SM, e soprattutto un ostacolo verso la ricezione di servizi che possono migliorare sensibilmente i loro sintomi e la loro qualità di vita.

I Percorsi Diagnostico-Terapeutici e Assistenziali (PDTA) hanno l'obiettivo di facilitare l'iter delle persone con SM, attribuendo ruoli e responsabilità specifiche ai diversi snodi del sistema dei servizi che devono costituirsi come rete, e sono indicati dal Piano Nazionale della Cronicità come uno strumento essenziale per la gestione dei pazienti cronici.

Ad oggi esistono in Italia 14 PDTA Regionali per la SM, alla cui stesura AISM ha partecipato in modo continuativo, e AGENAS ha recentemente pubblicato un documento nazionale che contiene indicazioni per la creazione delle reti di assistenza, anch'esse messe a punto con la collaborazione di AISM.

Il lavoro quotidiano che AISM svolge sul territorio mostra però che affinché le persone con SM possano effettivamente beneficiare dei percorsi integrati che i PDTA definiscono è essenziale che questi siano recepiti e implementati a livello territoriale, ed è su questo elemento che verte il progetto triennale.

Il progetto triennale "Il PDTA come strumento di umanizzazione e personalizzazione dei percorsi di cura e assistenziali presso la Rete della SM" è stato lanciato nel 2020 da AISM con l'obiettivo di facilitare, supportare e accompagnare la stesura e l'implementazione di PDTA aziendali capaci di garantire continuità nella presa in carico attraverso tutti gli snodi del sistema dei servizi sul territorio, a partire dai bisogni delle persone con SM e massimizzando il contributo della loro associazione. A questo scopo AISM ha previsto 3 fasi, più una supplementare:

- 1) Raccolta e analisi di dati, sullo stato dell'arte della presa in carico delle persone con SM nelle varie fasi della pandemia, in particolare sulla capacità delle reti territoriali di realizzare percorsi assistenziali transmurales, anche avvantaggiandosi delle trasformazioni rese necessarie dall'emergenza sanitaria (2020-2021);
- 2) Pilota della sperimentazione presso l'IRCSS San Martino di Genova (2021-2022) attraverso la messa a punto di un prototipo di PDTA integrato ospedaliero e territoriale e

alla sua implementazione sperimentale a partire dal territorio di riferimento del Centro Clinico dell'azienda;

- 3) Diffusione e disseminazione di specifici moduli del prototipo di PDTA messo a punto al S. Martino in ulteriori 10 Centri SM in altrettante Regioni Italiane (2022-2023);
- 4) Fase supplementare, dedicata all'estensione della diffusione e alla disseminazione modulare a 10 ulteriori Centri SM (2023)

## RISULTATI

La Fase 1 del progetto ha consentito di osservare e analizzare la capacità di risposta del sistema dei servizi ai bisogni delle persone con SM con tre diverse indagini, realizzate tra marzo 2020 e aprile 2021, nell'ambito delle quali sono stati completati 6.599 questionari da almeno 2.722 persone con SM (il numero reale di partecipanti unici è probabilmente maggiore ma sconosciuto, poiché solo una frazione di loro ha fornito l'indirizzo email che consente il collegamento delle risposte alle diverse edizioni). Nel 2021 è stata avviata un'altra indagine, sui Centri clinici per la SM presenti in Italia, completata da 167 Centri SM, il 70% del totale, che hanno in carico circa 100.000 pazienti su una popolazione totale con SM di 130.000 persone.

Nel 2021 è stato avviato il pilota presso l'IRCSS S. Martino, dove è stato attivato il gruppo di lavoro che include la direzione generale, il personale del Centro SM, infermieri ospedalieri e di territorio, assistenti sociali, medici di medicina generale, psicologi, operatori della riabilitazione, referenti della ASL e dei servizi sociali territoriali comunali.

## CONCLUSIONI

La pandemia ha avuto un impatto significativo sulla rete dei servizi per la SM, generando discontinuità nella loro erogazione e difficoltà di accesso supplementari per le persone con SM, specie durante le fasi più critiche dell'emergenza. Nello stesso tempo la necessità di superare queste difficoltà ha accelerato molte trasformazioni: in particolare gli strumenti digitali per la gestione dei dati clinici e delle prestazioni, e la telemedicina si sono diffusi in modo sensibile.

Queste trasformazioni costituiscono una base importante per la realizzazione e l'implementazione dei PDTA poiché consentono di estendere la capacità della rete dei servizi di raggiungere le persone con SM, di migliorare il rapporto con esse soprattutto quando i dati clinici sono accessibili a tutti gli attori delle cure, e di migliorare la collaborazione tra professionisti che afferiscono a organizzazioni diverse.

# Care Pathways (PDTA) as a tool towards humanization and personalization of care in MS

## INTRODUCTION AND AIMS

MS causes a very wide variety of symptoms, that change and evolve over time, often towards a progressive worsening of health conditions. Years after diagnosis, MS can lead to significant limitations of autonomy, and to disability. Therefore, throughout their lives people with MS need a variety of very different health and social care services: from consultations with several specialists other than the neurologist (e.g. urologists, gastroenterologists, gynecologists, etc.) to rehabilitation and occupational therapy, psychological support, up to personal and home assistance and aids, and access to social protection measures and social and work inclusion.

Despite major investments in service integration, and the progress made over time, care and assistance systems still face difficulties in ensuring that people with MS have smooth and timely access to the diverse services they need. Having to autonomously navigate between services and providers that can be very distant from each other from an organizational point of view (eg. hospital, community, primary care, social care, etc.) constitutes an additional burden for people with MS, and above all an obstacle

to receiving services that could significantly improve their symptoms and their quality of life.

Care Pathways (PDTA, Italian acronym for Diagnostic-Therapeutic and Assistance Pathways) are indicated by the National Chronicity Plan as an essential tool for the management of chronic patients. They aim to streamline the journey of people with MS, attributing specific roles and responsibilities to providers that must be part of, and act as, a network of services.

To date there are 14 Regional PDTAs for MS in Italy, in the drafting of which AISM has continuously participated. AGENAS has recently published a national document that contains indications for the creation of networks of care, also developed with the collaboration of AISM.

However, the day-to-day work that AISM carries out on the territory shows that people with MS effectively benefit from the integrated pathways that the PDTAs define only if these are received and implemented at a local level, and this is what the three-year project focuses on.

The three-year project "PDTAs as a tool for the humanization and personalization of care and assistance paths in the MS Network" was launched in 2020 by AISM with

the aim of facilitating, supporting and accompanying the drafting and implementation of local PDTAs capable of ensuring continuity in care management through the whole local service system, starting from the needs of people with MS and maximizing the contribution of their association. AISM broke down the work into 3 phases, plus an additional one:

- 1) Data collection and analysis on the care received by people with MS in the various phases of the pandemic, in particular on the actual ability of provider networks to carry out integrated care pathways, also taking advantage of the transformations made necessary by the health emergency (2020-2021);
- 2) Piloting the intervention at the IRCSS San Martino in Genoa, by means of the development of a prototype of integrated PDTA and its experimental implementation in the area served by the Clinical Center for MS of the IRCSS; (2021-2022)
- 3) Dissemination and diffusion of specific modules of the PDTA prototype developed at San Martino, in a further 10 MS Centers in as many Italian Regions (2022-2023);
- 4) Additional phase, dedicated to the extension of diffusion and modular dissemination to 10 additional MS Centers (2023).

## RESULTS

Phase 1 of the project led to observing and analyzing the responsiveness of the service system to the needs of people with MS by means of three different surveys, carried out between March 2020 and April 2021. 6,599 questionnaires were completed by at least 2,722 people with

MS (the actual number of unique participants is probably higher but unknown, as only a fraction of them provided the email address that allows linking responses across different editions).

In 2021, another survey was conducted among MS Clinical Centers in Italy, completed by 167 MS Centers, 70% of them, which follow roughly 100.000 patients out of a total population with MS of 130,000 people.

In 2021 the pilot was launched at IRCSS S. Martino, and a comprehensive working group was activated. It includes the general management, the staff of the MS Center, hospital and community nurses, social workers, general practitioners, psychologists, rehabilitation operators, contact persons of the ASL and of the municipal territorial social services was activated.

## CONCLUSIONS

The pandemic has had a significant impact on the network of MS services, generating discontinuity in their provision and additional access difficulties for people with MS, especially during the most critical phases of the emergency. At the same time, the need to overcome these difficulties has accelerated many transformations: in particular, digital tools for the management of clinical data and performance, and telemedicine have spread considerably.

These transformations constitute an important basis for the creation and the implementation of PDTAs since they allow extending the capacity of the service network to reach people with MS, improving the relationship with them especially when clinical data are accessible to all actors of the care, and improving collaboration between professionals employed by different organizations.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Manacorda T, Bandiera P, Terzuoli F, Ponzio M, Brichetto G, Zarin P, Bezzini D, Battaglia MA. Impact of the COVID-19 pandemic on persons with multiple sclerosis: Early findings from a survey on disruptions in care and self-reported outcomes. *J Health Serv Res Policy*. 2021 Jul;26(3):189-197. doi: 10.1177/1355819620975069. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33337256; PMCID: PMC8182334.
- Manacorda T, Battaglia MA, P. Bandiera P, Ponzio M, Bezzini D. Covid-19 pandemic in the life of persons with MS in Italy. *ECTRIMS 2021*
- Manacorda T, Battaglia MA, P. Bandiera P, Ponzio M, Bezzini D. Riavviare e rinnovare il sistema dei servizi per proteggere la popolazione con patologie croniche. Il caso della Sclerosi Multipla. 54 Congresso Nazionale SITI Società Italiana di Igiene Medicina Preventiva e Sanità Pubblica "La Sanità Pubblica nel Post Covid" (Poster n. 513)

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 e l'ammontare di 350.000 €**  
FISM Research special project funded in in 2020 and the amount of € 350,000

---

**SM progressiva**

Progressive MS

---



# Sviluppo di un brevetto per nuovi modulatori di GPR17, un recettore chiave nei processi di rimielinizzazione



**Maria Pia Abbraccio\*, Ivano Eberini\*\***

*\*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

*\*\*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Marta Fumagalli, Chiara Parravicini, Davide Lecca, Davide Marangon**

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'avvento dei farmaci immunomodulatori per la SM ha finalmente permesso di fare affidamento su terapie modificanti la malattia (DMT), che hanno notevolmente migliorato la prognosi della SM e la qualità di vita dei pazienti. I DMT possono ridurre il numero di ricadute e rallentare il danno che si accumula nel tempo, riducendo il numero di pazienti che progrediscono verso la forma irreversibile della malattia. Tuttavia, essi non rappresentano una cura, poiché non possono riparare lesioni già esistenti e non favoriscono la rimielinizzazione delle stesse. La novità di questo progetto risiede nello sviluppo di farmaci nuovi e originali con attività promielinizzante che agiscono con un meccanismo d'azione completamente diverso, ovvero interagendo specificamente con GPR17, un recettore chiave espresso dai progenitori oligodendrocitari (OPC) e coinvolto in modo cruciale nel loro differenziamento in cellule mature produttrici di mielina. In particolare, il progetto mira al completamento di un pacchetto preclinico attraverso lo studio di un sottoinsieme di 50 entità chimiche completamente nuove, selezionate in silico a partire da una matrice di 256 composti, appartenenti a una famiglia brevettata per usi terapeutici da FISM/UNIMI e potenzialmente in grado di riparare le lesioni mieliniche nei pazienti con SM.

## RISULTATI

Alcuni dei composti coperti dal brevetto di cui sopra si sono rivelati molto efficaci sia nell'attivare il recettore GPR17 in colture cellulari che nel promuovere la mielinizzazione in colture miste di OPC e neuroni. Inoltre, uno di essi, una molecola estremamente selettiva per GPR17 (nome di fantasia: galinex), scelta come prototipo sulla base di studi di

farmacocinetica in silico e in vivo, ha ritardato significativamente l'insorgenza della malattia quando utilizzata in un modello sperimentale di riferimento per la sclerosi multipla (encefalomielite autoimmune sperimentale, EAE). Recentemente, abbiamo riesaminato un enorme database chimico (contenente circa un milione di molecole), prodotto in precedenza nel corso del progetto che ha portato alla scoperta di galinex, con l'obiettivo di sviluppare nuove molecole chimicamente originali, mediante analisi di clustering in silico e prioritizzazione chemoinformatica. Prima di effettuare la sintesi di questi composti, abbiamo valutato il profilo farmacocinetico e la potenziale attività a livello del sistema nervoso centrale (SNC) attraverso procedure computazionali. Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo sviluppato un modello di relazione quantitativa struttura-attività (QSAR) in grado di valutare molto rapidamente l'attività di queste molecole sulla base della loro struttura chimica. I 50 composti più promettenti sono stati poi sintetizzati e testati in saggi di riferimento su colture cellulari, i quali hanno dimostrato un'elevata attività sul bersaglio di nostro interesse, ovvero il recettore GPR17. Per identificare le molecole più promettenti su cui proseguire gli studi, abbiamo applicato l'innovativo metodo SPILLO-PBSS, che aiuta a valutare quali molecole presentano la minore probabilità di interagire con target diversi dal GPR17, nel tentativo di ridurre al minimo effetti aspecifici, potenzialmente tossici, collaterali o imprevisi.

## CONCLUSIONI

Ad oggi, abbiamo caratterizzato in vitro il profilo di 20 molecole su un totale di 50. L'attività dei restanti 30 composti è stata stimata in silico, mediante il modello QSAR. Ora miriamo a selezionare e far avanzare i candidati più promettenti,

al fine di completare il nostro pacchetto preclinico e attrarre così partner esterni interessati allo sviluppo di farmaci ad attività rimielinizzante. Prevediamo che questi ligandi vengano utilizzati anche in combinazione con i DMT già disponibili, in modo da ottenere un effetto sinergico. Infatti, la mielinizzazione promossa da GPR17 è profondamente inibita dall'infiammazione, che può, invece, essere contrastata dai farmaci immunomodulatori. L'uso di tali terapie combinate dovrebbe

anche consentire ai medici di ridurre le dosi di DMT, riducendo così gli effetti collaterali che sono spesso associati alla loro somministrazione. Ciò comporterà una migliore tollerabilità, una prognosi migliore, un'ulteriore riduzione della progressione della malattia e, possibilmente, un'inversione della SM, cosa che finora non è mai stata possibile. Infine, ci aspettiamo che queste molecole siano attive in altre malattie del SNC caratterizzate da demielinizzazione.

## Patent development of new modulators of GPR17, a key receptor in remyelinating processes

### INTRODUCTION AND AIMS

The introduction of immunomodulatory drugs for MS has finally made it possible to rely on disease modifying therapies (DMTs), that have greatly ameliorated MS prognosis and patients' quality of life. DMTs can reduce the number of relapses and slow down the damage that builds up over time, reducing the number of patients progressing to the irreversible form of the disease. However, DMTs aren't a cure for MS, since they cannot repair already existing lesions and do not foster the remyelination of new ones. The novelty of this project stays in the development of new, original pro-myelinating drugs acting with a completely different mechanism of action, i.e., by specifically interacting with GPR17, a key receptor expressed by oligodendrocyte progenitors (OPCs) and crucially involved in their differentiation to mature myelinating cells. We specifically aim at the completion of a pre-clinical package on a subset of 50 synthesized entirely new chemical entities out of a matrix of 256 in-silico designed compounds, belonging to a family patented for therapeutic uses by FISM/UNIMI and potentially able to repair myelin lesions in MS patients.

### RESULTS

Briefly, some of the compounds covered by the above patent proved to be very effective both in activating human GPR17 in cell culture assays and in inducing myelination in mixed cultures of OPCs and neurons. One of them, an extremely GPR17 selective molecule (fantasy name: galinex), chosen as a prototype on the ground of in vitro and in vivo pharmacokinetic studies, significantly delayed the onset of the disease when utilized in a reference experimental model of multiple sclerosis (i.e., experimental immune encephalomyelitis, EAE). More recently, we have re-screened a huge chemical database (containing approximately one million molecules) that had been produced earlier as part of the same project leading to galinex. The aim was to develop novel, chemically original molecules, by means of in silico clustering analysis and chemoinformatic prioritization. Before carrying out their chemical synthesis, we predicted with computational

procedures the pharmacokinetic profile and the potential activity of such molecules at the level of the central nervous system (CNS). The 50 most promising selected compounds were then synthesized and tested in reference assays on cell cultures, in which they appeared very active on the receptor of our interest, i.e. GPR17. On the ground of the obtained results, we developed a quantitative structure-activity relationship (QSAR) model able to very rapidly assess the activity of several more molecules, making reference to their chemical structure. In order to try identifying which of the active molecules could be further developed, we applied the innovative method SPILLO-PBSS that helps evaluate which of the molecules being assessed has the least probability of interacting with targets other than GPR17, in an attempt to reduce to a minimum off-target, hence potentially toxic, collateral or unexpected effects.

### CONCLUSIONS

Up to now, we have characterized in vitro the profile of 20 molecules out of a total of 50. The activity of the remaining 30 compounds has been estimated in silico, via the in-house developed QSAR model. We now aim at selecting and advancing the most promising lead candidates of this set of new chemical entities, to exploit our preclinical package to more advanced step towards the development of re-myelination drugs. We expect these ligands to be also used in combination with the already available DMTs, likely reinforcing each other's action. In fact, GPR17 promoted myelination is profoundly inhibited by inflammation, which can, instead, be counteracted by immunomodulatory drugs. Use of such combination therapies is also expected to enable physicians to reduce the doses of DMTs, thus ameliorating the side effects that are often associated to their administration. This will further result in better tolerability, better prognosis, further reduced disease progression and, possibly, in MS reversal, something that has never been possible so far. Finally, we expect these molecules to be active in other CNS diseases characterized by demyelination.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Angelini, J; Marangon, D; Raffaele, S; Lecca, D; Abbracchio, MP. The Distribution of GPR17-Expressing Cells Correlates with White Matter Inflammation Status in Brain Tissues of Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 27;22(9):4574. doi: 10.3390/ijms22094574
- Lecca D, Abbracchio MP, Fumagalli M. Purinergic Receptors on Oligodendrocyte Progenitors: Promising Targets for Myelin Repair in Multiple Sclerosis?. *Front Pharmacol.* 2021 Jan 27;11:629618. DOI: 10.3389/fphar.2020.629618
- Lecca D, Raffaele S, Abbracchio MP, Fumagalli M. Regulation and signaling of the GPR17 receptor in oligodendroglial cells. *Glia.* 2020 Oct;68(10):1957-1967. doi: 10.1002/glia.23807
- Parravicini C, Lecca D, Marangon D, Coppolino GT, Daniele S, Bonfanti E, Fumagalli M, Raveglia L, Martini C, Gianazza E, Trincavelli ML, Abbracchio MP, Eberini I. Development of the first in vivo GPR17 ligand through an iterative drug discovery pipeline: A novel disease-modifying strategy for multiple sclerosis. *PLoS One.* 2020 Apr 22;15(4):e0231483. doi: 10.1371/journal.pone.0231483. eCollection 2020
- Capelli D, Parravicini C, Pochetti G, Montanari R, Temporini C, Rabuffetti M, Trincavelli ML, Daniele S, Fumagalli M, Saporiti S, Bonfanti E, Abbracchio MP, Eberini I, Ceruti S, Calleri E, Capaldi S. Surface Plasmon Resonance as a Tool for Ligand Binding Investigation of Engineered GPR17 Receptor, a G Protein Coupled Receptor Involved in Myelination. *Front Chem.* 2020 Jan 10;7:910. doi: 10.3389/fchem.2019.00910. eCollection 2019
- Coppolino GT, Marangon D, Negri C, Menichetti G, Fumagalli M, Gelosa P, Dimou L, Furlan R, Lecca D, Abbracchio MP. Differential local tissue permissiveness influences the final fate of GPR17-expressing oligodendrocyte precursors in two distinct models of demyelination. *Glia.* 2018 May;66(5):1118-1130. doi: 10.1002/glia.23305
- Fumagalli M, Lecca D, Coppolino GT, Parravicini C, Abbracchio MP. Pharmacological Properties and Biological Functions of the GPR17 Receptor, a Potential Target for Neuro-Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1051:169-192. doi: 10.1007/5584\_2017\_92. Review
- Bonfanti E, Gelosa P, Fumagalli M, Dimou L, Viganò F, Tremoli E, Cimino M, Sironi L, Abbracchio MP. The role of oligodendrocyte precursor cells expressing the GPR17 receptor in brain remodeling after stroke. *Cell Death Dis.* 2017 Jun 8;8(6):e2871. doi: 10.1038/cddis.2017.256
- Boccazzi M, Lecca D, Marangon D, Guagnini F, Abbracchio MP, Ceruti S. A new role for the P2Y-like GPR17 receptor in the modulation of multipotency of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Purinergic Signal.* 2016 Dec;12(4):661-672

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 401.805 €**  
FISM Research special project funded in in 2013 and the amount of € 401,805

# Una biobanca e un laboratorio dedicati alla raccolta e alla distribuzione di campioni biologici di SM, alla replicazione e condivisione di dati e alla validazione di metodi biologici



## Antonio Bertolotto

Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano (TO), Italia

COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Paola Valentino, Francesca Montarolo, Fabiana Marnetto**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Uno dei problemi principali nella ricerca clinica è la scarsa riproducibilità dei risultati e la ridotta implementazione nella pratica clinica. Questo è causato dalla mancanza di standardizzazione nella raccolta dei campioni, validazione dei metodi e condivisione dei dati. Le biobanche hanno lo scopo di potenziare la ricerca scientifica con la raccolta, conservazione e distribuzione di campioni biologici e dati associati di qualità, in base a specifiche norme etiche e legali. Il Centro Regionale di Riferimento Sclerosi Multipla (CRESM, AOU San Luigi) ha lavorato dal 2013 con il supporto di FISM per trasformare la collezione di campioni biologici/dati del CRESM in una biobanca strutturata.

La Biobanca del CRESM (BB-CRESM) è la prima biobanca in Italia focalizzata su SM/altre malattie neurologiche e prima in Piemonte a entrare nel consorzio italiano ed europeo di BBMRI (Biobanking and Biomolecular resources Research Infrastructure).

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di promuovere l'importanza del biobancaggio tra i ricercatori al fine di potenziare la ricerca attraverso l'utilizzo di campioni e dati di qualità.

### RISULTATI

A gennaio 2020 la BB-CRESM ha avuto il riconoscimento istituzionale dall'AOU San Luigi (delibera n°56/2020), passaggio cruciale nella vita di una biobanca. BB-CRESM ha ora un regolamento e una governance definita che include struttura organizzativa, politiche e procedure legali ed etiche che regolano ogni attività della biobanca. La documentazione legale/etica (opuscolo informativo e Consenso Informato, Valutazione dell'Impatto sulla Privacy, Procedure Operative Standard e documento MDTA), redatta in base al Regolamento Generale sulla Protezione dei Dati

(GDPR), è stata approvata dalla Direzione e dal Comitato Etico dell'AOU San Luigi.

Lo scopo delle biobanche è fornire campioni e dati di qualità, in accordo a norme e standard di qualità. La BB-CRESM ha quindi ottimizzato controlli di qualità periodici su campioni, dati e procedure. A questo scopo, sono stati valutati i livelli di integrità e purezza di campioni di RNA conservati in biobanca, che rappresentano i parametri più affidabili per valutare la conservazione del materiale biologico crioconservato, mostrando una qualità ottimale.

Inoltre, BB-CRESM ha definito accurate procedure per verificare la completezza, la correttezza e corrispondenza di specifici dati registrati nel database; anche questi controlli hanno dato ottimi risultati. Attualmente sono coinvolti nella biobanca circa 1.300 pazienti e 100 soggetti "sani" senza patologie neurologiche (HC), ognuno dei quali ha firmato il consenso informato trasparente e consapevole, atto fondamentale nel processo di coinvolgimento nella biobanca. In Biobanca vengono conservati 1) campioni appositamente donati per la Biobanca; 2) campioni raccolti durante gli studi di ricerca effettuati dal CRESM; 3) campioni diagnostici "residui", dell'attività diagnostica; 4) campioni derivati da "collezioni storiche", raccolti negli anni passati.

Durante il progetto, BB-CRESM ha anche coinvolto partecipanti sani (HC), un gruppo di controllo fondamentale. È stato preparato un "modulo di raccolta dati", che consente di identificare campioni/dati di partecipanti sani adatti ai criteri specifici di ciascun progetto.

Le biobanche sono istituzioni senza scopo di lucro e i campioni/dati non vengono venduti, tuttavia un parziale recupero dei costi è essenziale per la sostenibilità a lungo termine. In base alle linee guida del Ministero della Salute (Il materiale biologico IRCCS, 2020), la BB-CRESM ha stabilito una procedura di recupero dei costi basata su

1) tipologia del materiale biologico, 2) caratteristiche dei pazienti, 3) dati associati, 4) utilizzatori finali.

I campioni conservati sono siero (27% dei campioni), plasma (19%), DNA da sangue intero (16%), cellule del sangue (15%), RNA da sangue intero (20%), liquido cerebrospinale (3%). Ogni campione è suddiviso in aliquote di ridotti volumi in provette identificate con un codice a barre, come previsto dai requisiti di privacy e qualità.

I campioni appartengono a pazienti con SM (77% dei campioni), pazienti con altre malattie neurologiche e a HC. Vengono raccolti durante la fase diagnostica (11% dei campioni), prima dell'inizio del trattamento (13%) durante il follow-up (76%), e, dal 2021, anche durante le ricadute cliniche.

Durante questo progetto, sono stati distribuiti più di 600 campioni/dati per progetti di ricerca sulla SM all'Università San Raffaele (Dott.ssa Mechelli), ISS (Dott.ssa Aloisi), IRCCS Carlo Besta (Dott. Costanza). Inoltre, la BB-CRESM è stata coinvolta in un progetto su SARS-COV-2 (Prof. Rosati). La richiesta di campioni/dati è attualmente in corso per numerosi altri progetti.

Infine, per rispondere all'esigenza di creare una rete di biobanche neurologiche italiane, BB-CRESM ha redatto un questionario con i seguenti obiettivi: identificare la tipo-

logia di campioni biologici più utili per la ricerca, fotografare la situazione delle collezioni/biobanche esistenti nel campo della SM, promuovere la creazione di una rete di biobanche italiane sulla SM e informare i ricercatori sulla preziosità di questa realtà.

I dati ottenuti dall'analisi del questionario consentiranno la discussione e la condivisione delle procedure tra diversi centri, con lo scopo di creare linee guida comuni per le attività di biobancaggio.

## CONCLUSIONI

Grazie al supporto di FISM la BB-CRESM è oggi la prima Biobanca strutturata interamente dedicata alla SM/altre patologie neurologiche; ha l'obiettivo di raccogliere, conservare e distribuire campioni biologici e dati associati seguendo rigorosi criteri di qualità, nel rispetto dei soggetti coinvolti.

La BB-CRESM sta lavorando con il supporto di FISM per promuovere attività di biobancaggio al servizio della ricerca sulla SM, con l'obiettivo di garantire i massimi livelli di qualità alla ricerca scientifica finanziata da FISM.

## Il Contatto della biobanca:

biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it.

# A bio-bank and laboratory dedicated to collection and supply of biological samples of MS for replication and sharing of data, as well as validation of biological methods

## INTRODUCTION AND AIMS

One of the main issue in clinical research is poor data reproducibility and implementation of research results to clinical practice, due to lack of rigor in sample collection, methods validation and data sharing. Biobanks aim to enable and accelerate scientific research through collection, storage, and distribution of high quality biospecimens and associated data, in the respect of participants' rights, according to legal and ethical issues.

The Regional Reference Multiple Sclerosis Center (CRESM, AOU San Luigi) has been operational since 2013 in transforming its reserve of biological samples into a structured biobank.

The CRESM Biobank (BB-CRESM) is a non-profit organization mainly supported by FISM. It is the first Italian biobank focused on MS and other neurological diseases and the first biobank in Piedmont included in the Biobanking and Biomolecular resources Research Infrastructure (BBMRI) and European BBMRI-ERIC.

The final goal of this project was establishing the importance of biobanking among researchers to facilitate research through the utilization of quality samples and data.

## RESULTS

In January 2020, BB-CRESM received formal Institutional commitment by AOU San Luigi (deliberation n°56/2020), a crucial step for biobanks' quality system. BB-CRESM has a specific Regulation and a defined governance including an organizational structure, legal and ethical policies and procedures that regulate all biobanking operations.

Legal/ethical documentation (leaflet and Informed Consent, Privacy Impact Assessment, Standard Operating Procedure and MDTA document), written according to General Data Protection Regulation (GDPR), were approved by AOU San Luigi direction and Ethical Committee.

The purpose of a biobank is to supply high quality specimens and data in compliance with regulations and quality standards. Accordingly, BB-CRESM implemented and opti-

mized detailed quality controls on samples, data and procedures, which consist in periodic-planned random controls. In particular, quality control has been planned on RNA samples, which represent the most reliable parameter for evaluating storage of cryopreserved biomaterial. RNA integrity and purity were assessed on a subset of randomly selected biobanked RNA samples showing optimal results.

In addition, BB-CRESM defined accurate procedures to check completeness, consistency and relevance of critical data recorded in BB-CRESM databases; controls were accordingly performed demonstrating optimal results.

Biological samples/associated data of about 1,300 patients and 100 healthy participants are currently biobanked in BB-CRESM. Each participant signed BB-CRESM informed consent that represents a crucial act in the process of participant engagement.

Samples are collected in several ways: 1) samples specifically gift for the Biobank; 2) samples collected during research studies performed by CRESM; 3) diagnostic “residual” samples, remaining from the diagnostic activity; 4) samples from “historical collections”, collected in past years.

During the project, we also focused on Healthy participants (HC) engagement, as fundamental control group. A “data collection form” was prepared, allowing to identify proper HC samples/data according to specific criteria for each project.

Biobanks provide their services on a “no-profit” basis and samples/data are not sold, however a cost-recovery mechanism is necessary for long-term sustainability. According to biobanking guidelines published by Italian Ministry of Health (Il materiale biologico IRCCS, 2020), BB-CRESM established a detailed cost-recovery policy which takes into account 1) the different types of biospecimens, 2) patients’ characteristics, 3) the associated data, 4) the final users.

The biospecimens stored in BB-CRESM are serum (27% of samples), plasma (19%), whole blood DNA (16%), blood cells (15%), whole blood RNA (20%), CSF samples (3%). Each biospecimen is stored in small volume barcoded tubes, according to privacy and quality requirements.

Samples are collected mainly from MS patients (77% of

samples), from patients with other neurological diseases and from HC.

Samples are collected at diagnostic lumbar puncture (11% of samples), before treatment start (13%) and during follow-up (76%). In 2021, BB-CRESM implemented sample collection during relapses.

The final aim of BB-CRESM is the distribution of high quality samples/data: during the present project, more than 600 samples/data have been distributed to MS research projects from University San Raffaele (Dott.ssa Mechelli), ISS (Dott.ssa Aloisi), IRCCS Carlo Besta (Dott. Costanza). Further, BB-CRESM was involved in a project focused on SARS-COV-2 diagnosis (Prof. Rosati). Other collaborations are in progress, for which samples and data request is being defined.

Finally, to address the need of creating a network of Italian neurological biobanks, BB-CRESM drafted a survey to analyze the current status of sample collections among Italian MS centers. The survey aims to identify the most useful biospecimens for research, to identify Italian MS collections/biobanks, to promote the creation of a network of biobanks dedicated to MS and to inform researchers about the preciousness of structured biobanks for MS.

Data obtained by the survey analysis will allow discussion and sharing of procedures between different centers, which could lead to the creation of common guidelines for samples/data collection, storage and sharing.

## CONCLUSIONS

Thanks to FISM support, BB-CRESM is the first institutional Italian biobank focused on MS and part of BBMRI network. BB-CRESM is increasingly contributing to MS research, by collecting, storing and distributing high quality samples and associated data, based on strict quality methods, to enable data sharing and results reproducibility, in the respect of involved subjects.

A network of biobanks focused on MS would improve the excellence of FISM funded high quality research.

### The biobank contact:

biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it.





## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Martire S\*, Valentino P\*, Marnetto F, Mirabile L, Capobianco M, Bertolotto A. The impact of pre-freezing storage time and temperature on gene expression of blood collected in EDTA tubes. (submitted to Molecular Biology Reports)
- Valentino P, Marnetto F, Martire S, Malucchi S, Bava CI, Popovic M, Bertolotto A. Serum neurofilament light chain levels in healthy individuals: a proposal of cut-off values for use in multiple sclerosis clinical practice. Mult Scler Relat Disord 2021 Jun 17;54:103090
- Valentino P, Marnetto F, Montarolo F, Bava CI, Sforza ML, Capobianco M, Bertolotto A. Cost-recovery assessment: the proposal of CRESM Biobank. Poster, Europe Biobank Week 2021 (EBW2021)
- P. Valentino, F. Marnetto, S. Martire, M. Caldano, J. Bertolo, A. Bertolotto. Quality control in biobank samples: the impact of pre-freezing storage time and temperature on gene expression of blood collected in EDTA tubes. Poster, 25th World Congress of Neurology (WCN 2021)
- F. Marnetto, P. Valentino, C. Bava, F. Brescia, S. Martire, A. Bertolotto. sNFL as a biomarker for routine management of MS patients: the role of disease-based biobank. Europe Biobank Week 2020: Awarded as best poster in the session "Disease-based biobanking: paving the way for improved clinical practice"
- A. Bertolotto, P. Valentino, M. Caldano, A. Ficorilli, A. Paudice, F. Marnetto. BB-CRESM: An institutional biobank to support quality research in Multiple Sclerosis. Poster, 51° SIN congress virtual edition
- P. Valentino, F. Marnetto, S. Martire, C. Bava, M. Popovic, A. Bertolotto "Normal serum NFL levels: a proposal of cut-off strategy definition for the clinical practice., LB1219, Multiple Sclerosis Journal 2020; 26: (S3) 43-117
- P. Valentino, F. Marnetto, C. Bava, S. Martire, A. Bertolotto . Real-life experience with sNFL in multiple sclerosis patients, as monitoring and treatment decision biomarker. LB1220, Multiple Sclerosis Journal 2020; 26: (S3) 43-117
- A. Bertolotto, S. Malucchi, F. Marnetto, S. Martire, P. Valentino. Applicability of sNFL in multiple sclerosis as additional measure in clinical practice and implications in NEDA-3. LB1221. Multiple Sclerosis Journal 2020; 26: (S3) 43-117
- F. Marnetto, P. Valentino, M. Caldano, A. Ficorilli, A. Paudice, A. Bertolotto. BB-CRESM: a structured institutional biobank for quality research in multiple sclerosis. LB1245. Multiple Sclerosis Journal 2020; 26: (S3) 43-117
- Bertolotto A., Valentino P., Martire S., Bava C.I., Popovic M., Marnetto F. Normal serum NFL levels: a proposal of cut-off strategy definition for the clinical practice. Oral presentation, 51° SIN congress virtual edition
- Bertolotto A., Marnetto F., Martire S., Bava C.I., Valentino P. Real-life experience with sNFL in MS patients, as monitoring and treatment decision biomarker. Oral presentation, 51° SIN congress virtual edition
- Bertolotto A, S. Malucchi, F. Marnetto, S. Martire, P. Valentino. Applicability of sNFL in Multiple Sclerosis as additional measure in clinical practice and implications in NEDA-3 evaluation. Poster, 51° SIN congress virtual edition
- A .Bertolotto, M.Capobianco, A.Paudice, P.Zaratin, Foglia, F.Marnetto, P.Valentino. La Biobanca del CRESM: un servizio per potenziare la ricerca sulla Sclerosi Multipla. Webinar at European Biotech Week (EBW2020)
- P. Valentino "Real-life experience with sNFL in Multiple Sclerosis at CRESM: from cut-off values definition to application in the monitoring of MS patients. Invited speaker at Simoa Success Webinars 2020

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 e l'ammontare di 100.000 €**  
FISM Research special project funded in in 2020 and the amount of € 100,000



# Trapianto di cellule staminali neurali in pazienti con sclerosi multipla: studio di fase I



## Gianvito Martino

Unità di Neuroimmunologia, INSPE, Divisione di Neuroscienza, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Angela Genchi, Elena Brambilla, Francesca Sangalli, Marta Radaelli, Marco Bacigaluppi, Roberto Furlan, Annapaola Andolfo, Denise Drago, Cinzia Magagnotti, Giulia Scotti, Raffaella Greco, Paolo Vezzulli, Marco Bonopane, Daniela Capilupo, Daniela Belotti, Benedetta Cabiati, Linda Ottoboni, Lucia Moiola, Vittorio Martinelli, Letizia Leocani, Luca Vago, Paola Panina-Bordignon, Andrea Falini, Fabio Ciceri, Maria Pia Sormani, Giancarlo Comi, Mara Rocca, Giuseppe Gaipa**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da demielinizzazione e conseguente perdita assonale. Per le forme a ricadute e remissioni esistono numerosi trattamenti modificanti il decorso di malattia. Al contrario, per le forme progressive – in cui prevalgono fenomeni neurodegenerativi a fronte di una minima attività infiammatoria cronica – non sono attualmente disponibili strategie terapeutiche realmente efficaci. Il razionale per l'utilizzo di cellule staminali neurali fetali umane eterologhe (hfNPCs) nelle forme progressive di SM (SMP) si basa su evidenze precliniche che dimostrano la capacità di queste cellule di migrare nelle aree del SNC interessate dal processo patologico, di adattare il loro comportamento alle caratteristiche del microambiente, e di promuovere meccanismi di neuroprotezione e riparazione tissutale, strutturale e funzionale. Le hfNPCs sono infatti in grado di rilasciare molecole solubili attraverso cui interagiscono con neuroni, astrociti e microglia, esercitando un'azione neuroprotettiva e immunomodulante. STEMS è uno studio clinico di fase I volto a valutare fattibilità, sicurezza e tollerabilità della somministrazione intratecale, tramite rachicentesi, di dosi crescenti di hfNPCs in pazienti adulti con SMP. Il possibile rischio associato all'uso di una nuova tecnologia, alla procedura e al regime d'immunosoppressione è ben bilanciato dalla prospettiva di sviluppare una potenziale terapia innovativa per pazienti con attuali opzioni terapeutiche limitate.

## RISULTATI

Nel protocollo STEMS sono stati arruolati 12 pazienti divisi in 4 coorti di trattamento, ognuno dei quali ha ricevuto una singola dose di hfNPCs a dosaggio crescente fra ciascuna co-

orte (da  $0.7 \times 10^6 \pm 10\%$  cellule a  $5.7 \times 10^6 \pm 10\%$  cellule pro-ki-  
lo). La sperimentazione clinica proposta è stata disegnata per valutare la sicurezza di un Investigational Advanced Therapy Medicinal Product, di procedure e trattamenti ad esso associati. Dopo la firma del consenso informato e una fase di screening per valutare i criteri di inclusione/esclusione, i pazienti hanno iniziato il pre-trattamento immunosoppressivo con tacrolimus, associato ad adeguata profilassi antibiotica e antivirale, per prevenire il rigetto delle hfNPCs, come previsto in caso di trapianti eterologhi. Prima dell'infusione, il paziente è stato trattato con prednisone (con lo scopo di ridurre il rischio di reazioni allergiche/infusionali) e, in assenza di controindicazioni, è stata eseguita l'infusione intratecale lenta delle hfNPCs in regime ospedaliero. Ciascun paziente è stato strettamente valutato durante il follow-up di 96 settimane, tramite visite neurologiche, controlli neuroradiologici, potenziali evocati multimodali e tomografia a coerenza ottica (OCT). Sono inoltre state effettuate, prima e 3 mesi dopo il trapianto, analisi del liquor e del plasma dei nostri pazienti, volte alla valutazione longitudinale dell'assetto proteomico, metabolomico e citochinico. Gli endpoint di sicurezza utilizzati per raggiungere l'obiettivo primario dello studio hanno valutato possibili rischi legati alla procedura e all'iniezione di cellule, con lo scopo di escludere eventuali reazioni allergiche, la presenza di infezioni, lo sviluppo di tumori, e di valutare sopravvivenza globale, la sicurezza generale e tollerabilità. I possibili rischi sono stati minimizzati grazie ad un'attenta preparazione e valutazione in vitro delle hfNPCs secondo 'Good Manufacturing Practice'. Dall'approvazione della sperimentazione clinica STEMS (05/2017) a oggi (01/2022), sono stati trapiantati 12 pazienti ed è stato terminato il follow-up previsto (06/2021). Nessun evento avverso di grado

≥3 correlato alla somministrazione di hfNPCs, alla procedura o alla somministrazione di terapia immunosoppressiva è stato osservato. Non è stato osservato un peggioramento del quadro neurologico dei pazienti correlabile al trattamento. Lo studio dell'atrofia cerebrale nei due anni successivi il trattamento ha dimostrato un minor perdita di volume encefalico, e soprattutto di sostanza grigia, nei pazienti che hanno ricevuto il maggior numero di hfNPCs. Lo studio del profilo immunologico e proteomico liquorale ha dimostrato, dopo il trapianto, un cambiamento significativo in termini di fattori trofici, chemochine, citochine e proteine. L'analisi proteomica liquorale ha mostrato il coinvolgimento di pathways di neurogenesi, plasticità sinaptica e sviluppo assonale.

## CONCLUSIONI

Le cellule staminali neurali rappresentano una novità nelle neuroscienze rigenerative; studi preclinici e più recenti studi su pazienti con patologie neurodegenerative hanno aperto

enormi speranze sul possibile impiego di queste cellule nella pratica clinica. I risultati del nostro studio confermano i dati di sicurezza fino ad ora disponibili circa l'assenza di effetti collaterali di rilievo direttamente correlabili al trattamento con cellule staminali neurali. Il monitoraggio dei pazienti trattati ha evidenziato la sicurezza del trattamento con hfNPCs, della concomitante terapia immunosoppressiva, e della via di somministrazione intratecale che pone le cellule staminali in un ambiente più fisiologico rispetto alla via endovenosa, con minori rischi di eventi avversi sistemici. Pur non potendo prevedere i possibili effetti terapeutici delle cellule staminali neurali, questo studio fornisce importanti dati metodologici e di sicurezza per valutare la reale fattibilità di tale terapia cellulare nella SMP. Le evidenze cliniche ottenute e gli interessanti dati preliminari neuroradiologici associati al rimodellamento proteomico e citochinico liquorale pongono le basi per futuri studi su più ampie casistiche di pazienti.

# Neural Stem Cell Transplantation in multiple sclerosis patients: a phase I study

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, immune-mediated, inflammatory disease of the central nervous system (CNS), characterized by demyelination and consequent axonal loss. Although highly effective disease-modifying treatments (DMTs) are available for relapsing remitting MS, treatments for subjects with progressive MS (PMS) - in which neurodegenerative phenomenon prevail against a minimal chronic inflammatory activity - are mostly limited to symptomatic therapies. Human fetal Neural Precursor Cells (hfNPCs) represent a valuable option in MS, leveraging their extensively pre-clinically assessed therapeutic by-stander potential. Indeed, hfNPCs are able to migrate and home to the CNS injured areas (pathotropism), to adapt their behavior to the CNS microenvironment, and to promote neuroprotection, structural and functional tissue repair via different mechanisms. hfNPCs can interact with neurons, astrocytes and microglia through the release of soluble molecules, exerting neuroprotective and immunomodulatory properties. The primary objective of the STEMS clinical trial was to evaluate the feasibility, safety and tolerability of intrathecally administered hfNPCs in patients with PMS. The potential risks associated to a new technology, procedure and immunosuppression regimen, are well balanced by the potential benefit of an innovative therapy for patients with no available effective therapeutic options.

## RESULTS

In the STEMS clinical trial 12 subjects have been enrolled and divided in four treatment cohorts. Each cohort received a single escalating dose of cells, ranging from  $0.7 \times 10^6 \pm 10\%$  cells to  $5.7 \times 10^6 \pm 10\%$  cells of body weight. The clinical study has been designed to evaluate the safety of an Investigational Advanced Therapy Medicinal Product, and of its associated procedures and treatments. Patients that met inclusion criteria and signed the informed consent, started an immunosuppressive pretreatment with tacrolimus, associated with adequate antibiotic and antiviral prophylaxis, to prevent hfNPCs rejection, as expected in case of heterologous transplants. Before the infusion patients were treated with prednisone (with the aim of reducing the risk of allergic/infusion reactions) and, in the absence of contraindications, slow intrathecal infusion of hfNPCs was performed in hospital. Follow up was conducted for 96 weeks after administration and clinical monitoring for survival, safety, tolerability and overall changes in the neurological status, was assessed through neurological examinations, MRI scans, Multimodal Evoked Potential and Optical Coherence Tomography studies. Further, longitudinal (before and three months after transplant) cerebrospinal fluid (CSF) and plasma analyses (proteins, metabolites and cytokines) were performed. The safety endpoints, used to achieve the primary objective, aimed to exclude risks related to the cell injection procedure (allergic reactions, infections, tumor formation), and to evaluate the global survival, general

safety and tolerability, and changes in neurological conditions not related to the disease. These possible risks were minimized by the extensive in vitro and in vivo examinations (comprehensive of the hfNPCs infusion at supra maximal doses in immunosuppressed mice) of the medicinal product manufactured according to 'Good Manufacturing Practice'. As today (01/2022), since the approval of the clinical study STEMS (05/2017), all 12 planned patients received the treatment and the follow-up ended in June 2021. No adverse events of grade  $\geq 3$  related to the hfNPC administration, the procedure, or the immunosuppressive treatment, have been reported. While reaching the primary endpoint, our preclinical measures also support the concept that hfNPCs might work in a neuroprotective fashion as a source of trophic factors and a modulator of immunological functions. Although preliminary, increased levels into the CSF of proteins able to foster a neuroprotective remodeling of the CNS microenvironment were associated with a significantly reduced loss of the whole brain and grey matter volume, an association positively correlating with the number of injected hfNPCs.

## CONCLUSIONS

Neural stem cells represent a novelty in regenerative neuroscience; preclinical studies and several clinical trials are in progress for neurodegenerative diseases, opening new avenues to the therapeutic use of these cells in the clinical practice. The results of our study confirm the safety data available up to now, with no evidence of significant side effects directly related to neural stem cell treatment. The monitoring of the treated patients highlighted the safety of the hfNPCs, of the immunosuppressive treatment used to favor cell engraftment, and of the intrathecal route of administration, which places the stem cells in a more physiological environment than the intravenous route, with lower risks of systemic adverse events. Although reserving judgment on the therapeutic effects of stem cells, our study showed that hfNPC therapy in PMS is feasible, safe and tolerable. The preliminary exploratory research results on brain volume changes and CSF remodeling support future clinical studies with the highest dose of cells in a larger cohort of subjects.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Mozafari S, Deboux C, Laterza C, Ehrlich M, Kuhlmann T, Martino G, Baron-Van Evercooren A. Beneficial contribution of induced pluripotent stem cell-progeny to Connexin 47 dynamics during demyelination-remyelination. *Glia*. 2021 May;69(5):1094-1109. doi: 10.1002/glia.23950
- Mozafari, L; Starost, L; Manot-Saillet, Blandine; Garcia-Diaz, B; Kang T. Xu, Y; Roussel, D; Levy, M.J.F.; Ottoboni, L; Kim K-P; Schöler, HS; Kennedy, TE; Antel, J. P. Martino, G; Angulo, M. C.; Kuhlmann, T; Baron-Van Evercooren, A. Multiple sclerosis iPS-derived oligodendroglia conserve their properties to functionally interact with axons and glia in vivo. *Science Advances* 04 Dec 2020: Vol. 6, no. 49, eabc6983
- Ottoboni L, von Wunster B, Martino G. Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Front Neurol*. 2020 Mar 20;11:148. doi: 10.3389/fneur.2020.00148. eCollection 2020
- Butti E, Bacigaluppi M, Chaabane L, Ruffini F, Brambilla E, Berera G, Montonati C, Quattrini A, Martino G. Neural Stem Cells of the Subventricular Zone Contribute to Neuroprotection of the Corpus Callosum after Cuprizone-Induced Demyelination. *J Neurosci*. 2019 Jul 10;39(28):5481-5492. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0227-18.2019. Epub 2019 May 28
- Bacigaluppi M, Sferruzza G, Butti E, Ottoboni L, Martino G. Endogenous neural precursor cells in health and disease. *Brain Res*. 2020 Mar 1;1730:146619. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146619

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 560.000 €**  
FISM Research special project funded in 2017 and the amount of € 560,000

---

# **Verso nuovi trattamenti**

Towards  
new treatments

---

# Un approccio basato sulla genetica per identificare farmaci per la SM: sviluppo di brevetti dei geni candidati



## Francesco Cucca

Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli studi di Sassari  
Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Edoardo Fiorillo, Matteo Floris, Laura Idda, Marco Masala, Mara Marongiu, Stefania Olla, Andrea Angius, Valeria Orrù, Mauro Pala, Clelia Peano, Maristella Pitzalis, Carlo Sidore, Maristella Steri, Magdalena Zoledziewska**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Eleonora Cocco**, Università degli Studi di Cagliari, e Centro Regionale Sclerosi Multipla, Cagliari, Italia

**Rachael Bashford-Rogers**, University of Oxford, UK

**Kylie James**, Sanger Center, Cambridge, UK

**Nicola Segata**, Centre of Computational Metagenomics, Università degli Studi di Trento, Trento, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Un gran numero di evidenze indica che la sclerosi multipla (SM) è causata da un processo autoimmune, ma i tipi di cellule immunitarie critiche e i meccanismi rimangono elusivi. In questo progetto, ci proponiamo di delucidarli concentrandoci sul ruolo del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT). Il coinvolgimento del GALT nella SM è suggerito da nostre osservazioni preliminari che indicano che: i) una variante del gene BAFF aumenta sia il rischio di SM che i livelli ematici di cellule GALT (Steri et al., 2017); ii) molti segnali da studi di associazione genome-wide-association-studies (GWAS) della SM puntano a geni correlati al GALT. Abbiamo così proposto di analizzare il ruolo di GALT nella SM attraverso 4 blocchi sperimentali (WPs). Il WP1 è indirizzato ad ampliare il numero di associazioni genetiche coincidenti tra le componenti GALT e il rischio di SM. A questo scopo, amplieremo, attraverso la citofluorimetria e nuovi metodi altamente sensibili, il numero di tratti GALT profilati nel sangue periferico di 3.300 volontari SardiNIA della popolazione generale, già caratterizzati geneticamente. Estenderemo anche i GWAS esistenti caso-controllo per la SM, a ~5.000 pazienti con SM e ~5.000 controlli sani. Questi dati saranno utilizzati per legare causalmente le componenti GALT e il rischio genetico della SM.

Nel WP2 risolveremo i segnali GWAS - del WP1 - identificando i geni causali: profilando il tipo di cellula maggior-

mente correlato alla SM, con RNAseq; caratterizzando i livelli di RNA di regolazione genetica (eQTLs); e identificando le associazioni coincidenti tra i segnali eQTLs e il rischio SM.

Nel WP3 valuteremo se le specie batteriche intestinali siano rappresentate in modo differenziato nei volontari SardiNIA della popolazione generale che hanno livelli estremi di componenti GALT e genotipi GALT correlati, rispettivamente, con un rischio alto e basso di sviluppare la SM. Una composizione sbilanciata del microbiota sarebbe una forte prova a supporto del ruolo delle cellule GALT dell'intestino - rilevate nel sangue periferico - nella suscettibilità per SM. Sempre nel WP3 sequenzieremo contemporaneamente il repertorio del recettore delle cellule B (BCR) e l'intero trascrittoma a livello di singole cellule, nel liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti con SM all'esordio prima della terapia. I cloni di cellule B GALT identificati nel CSF grazie a questo esperimento saranno quindi tracciati nel sangue periferico per scoprire se nel CSF dei pazienti esista effettivamente un arricchimento di cloni di cellule B GALT derivanti dal sangue periferico, coerente con un ruolo di queste cellule nell'autoreattività della SM nel sistema nervoso centrale. Infine, sulla base dei risultati dei WP precedenti, nel WP4 selezioneremo bersagli farmacologici primari, identificheremo, in silico, composti in grado di modularli e svilupperemo, in vitro, saggi cellulari per valutare la loro efficacia.

## RISULTATI

Finora abbiamo analizzato ~3.000 tratti dell'immunità mucosale, mediante citofluorimetria, in 4.000 volontari ProgeNIA. In tali tratti l'ereditabilità risultava in media del 40% e l'analisi GWAS sui primi 792 tratti ha identificato 5 loci genetici legati alla SM. Uno di questi riguardava la regolazione genetica di CD40 e CD27 nelle cellule B. Per studiare le basi biologiche di questa regolazione stiamo profilando i livelli solubili di CD27, CD40 e CD40L, su 3.500 volontari ProgeNIA con xMAP® della Luminex. Gli altri segnali di associazione con la SM (nei loci MIR181A1HG, FOXP1, ZBP2-GSDMB e EPS15L1) suggeriscono il coinvolgimento di una vasta gamma di cellule B con marcatori di immunità mucosale. Le analisi genetiche e funzionali sono in corso.

Per quanto riguarda il profilo del metagenoma, abbiamo finora estratto il DNA batterico dai campioni fecali di 2.800 volontari ProgeNIA. Stiamo preparando le librerie per il sequenziamento con Illumina Novaseq 6000.

Per studiare invece lo scambio di cloni di cellule B del GALT, tra il liquido cerebrospinale (CSF) e il sangue periferico, stiamo sequenziando, con *single cell* RNAseq - accoppiato al profilo TCR e BCR - il CSF di pazienti con SM. Finora abbiamo raccolto cellule mononucleate del sangue periferico e CSF di 20 pazienti e li abbiamo crioconservati a causa di vincoli sperimentali. Per valutare se la crioconservazione possa avere un impatto sui nostri risultati,

abbiamo profilato 4 individui con SM e abbiamo trovato una composizione cellulare simile a quella identificata in letteratura nel CSF di pazienti con SM analizzati con la stessa tecnologia. Le analisi per valutare se i repertori recettoriali sono stati influenzati dalla crioconservazione sono ancora in corso.

Per quanto riguarda l'identificazione di potenziali composti farmacologici, con uno screening virtuale abbiamo identificato 120 small molecules - in grado di inibire l'interazione di BAFF con il recettore BAFFR - e le abbiamo testate con il test MTT e una linea stabile che è stata generata nel nostro laboratorio. L'esperimento condotto finora ha portato al brevetto IT DR/19179PCT.

## CONCLUSIONI

Analizzando i primi 792 tratti dei 3.000 raccolti, abbiamo identificato 5 associazioni genetiche correlate sia con i tratti dell'immunità mucosale che con l'insorgenza della SM, e identificato potenziali bersagli terapeutici. Poiché è stata osservata una grande ereditabilità (in media il 40%) in tali tratti, siamo fiduciosi di trovare ulteriori loci con il completamento delle analisi. L'analisi del microbiota e dei cloni autoreattivi nella SM è in corso. I dati sono risultati finora di buona qualità. Complessivamente, i risultati ottenuti in questo progetto rafforzeranno le relazioni causa-effetto con l'insorgenza della malattia e apriranno nuove strategie per il suo trattamento e la prevenzione.

# A genetic toolbox in MS drug discovery: patent development of candidate genes

## INTRODUCTION AND AIMS

A large body of evidence indicates that multiple sclerosis (MS) is caused by an autoimmune process, but the critical immune cell types and mechanisms remain elusive. In this project we aim to elucidate them with a focus on the role of gut-associated lymphoid tissue (GALT). GALT's involvement in MS is suggested by our preliminary observations which indicate that i) a variant of the BAFF gene increases both the risk of MS and the blood levels of GALT cells (Steri et al., 2017); ii) many genetic signals from MS genome-wide-association-studies (GWAS) point to genes related to GALT. We thus proposed to dissect the role of GALT in MS in 4 integrated work-packages (WPs). WP1 is addressed at enlarge the number of coincident genetic associations between GALT components and MS risk. Toward this aim, we will expand, through cytofluorimetry and new highly sensitive methods, the number of GALT traits profiled in peripheral blood of up to 3,300 general population SardiNIA volunteers, already genetically cha-

racterized. We will also extend existing case-control MS GWAS to ~5,000 MS patients and ~5,000 healthy controls. These data will be used to causally link GALT components and genetic MS risk.

In WP2 we will resolve GWAS signals - from WP1 - to causal genes by profiling, the cell type mostly related to MS, with RNAseq, characterizing RNA levels genetic regulation (eQTLs), and identifying coincident associations between eQTLs signals and MS risk.

WP3 aims to further corroborate the role of GALT in MS. In particular, we will first assess whether gut bacterial species are differentially represented in general population SardiNIA volunteers having extreme levels of GALT components and GALT genotypes related, respectively, with a high and low risk of developing MS. A skewed composition of microbiota would be strong evidence linking the GALT cells originated in the gut - and detected in peripheral blood - to MS risk. We will then simultaneously sequence the B cell receptor repertoire (BCR) and the entire transcrip-



tome at the single cell level in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS at onset prior to therapy. GALT B cell clones identified in CSF will be tracked in peripheral blood to find out if there is indeed an enrichment of GALT B cell clones derived from the peripheral blood in the CSF of patients, consistent with a role of these cells in MS autoreactivity in the central nervous system. Finally, based on the findings of the previous WPs, in WP4 we will select prime drug targets, identify, in silico, compounds able to modulate them and develop, in vitro, cell assays to assess their efficacy.

**RESULTS**

Thus far we analyzed ~3,000 mucosal immunity traits with the cytofluorimeter in 4,000 ProgeNIA volunteers. Their heritability of these traits was about 40% on average and GWAS analysis on the first 792 traits identified 5 genetic loci related to MS. One of these regarded the genetic regulation of CD40 and CD27 on B cells. To study the biological bases of this regulation we are profiling the soluble levels of CD27, CD40 and CD40 ligand, on 3,500 ProgeNIA volunteers with Luminex’s xMAP®. The other MS association signals (in MIR181A1HG, FOXP1, ZPBP2-GSDMB and EPS15L1 loci) uncover a broad range of B cells with a suggestive significance. Genetic and functional analyses are ongoing. About the metagenome profiling, thus far we extracted bacterial DNA from faecal samples from 2,800 ProgeNIA volunteers. We are preparing the libraries for sequencing with Illumina Novaseq 6000. To study the exchange of GALT B cell clones between cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood, we are sequencing, with single cell RNAseq - coupled with TCR

and BCR profiling- the CSF of MS patients. Thus far we collected peripheral blood mononuclear cell and CSF of 20 patients. Due to experimental constrains, we have to cryopreserve the CSF samples. To assess whether cryopreservation could impact our results, we profiled 4 MS individuals and found similar cellular composition as identified in literature in CSF from MS patients analyzed with same technology. Analyses to assess whether receptor repertoires were biased by cryopreservation are still ongoing. About the identification of potential drug compounds, with virtual screening we identified 120 small molecules - able to inhibit the interaction of BAFF with the receptor BAFFR - and tested them with MTT assay and a stable line which has been generated in our laboratory. The experiment conducted so far led to IT Patent DR/19179PCT and those for validating the inhibitory ability of the best compounds are in progress.

**CONCLUSIONS**

By analyzing the first 792 traits of the 3,000 collected thus far, we identified 5 genetic associations correlated with both mucosal immunity traits and the onset of MS and identified potential therapeutic targets. Because high heritability (40% on average) was observed in these traits, we are confident of finding additional loci as the analyses are completed. Analysis of the microbiota and autoreactive clones in MS is ongoing and all them passed quality controls. Overall, the results obtained in this project will strengthen the cause-and-effect relationships with disease onset and open new strategies for its treatment and prevention.



**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**

- Sidore C, Orrù V, Cocco E, et al. PRF1 mutation alters immune system activation, inflammation, and risk of autoimmunity. *Mult Scler.* 2021 Aug;27(9):1332-1340
- Orrù V, Steri M, Sidore C, et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy. *Nat Genet.* 2020 Oct;52(10):1036-1045

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 1.050.000 €**  
 FISM Research special project funded in 2019 and the amount of € 1,050,000



# Impatto dei fattori genetici e dei farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla sulle risposte immunitarie cellulari e umorali dopo la vaccinazione contro Sars-Cov-2: studio pilota in Sardegna



## Francesco Cucca

*Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli studi di Sassari  
Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Marcella Devoto, M. Laura Idda, Valeria Lodde, Giuseppe Delogu, Maristella Pitzalis, Magdalena Zoledziewska, Giusi Marini, Annalisa Loizedda, Valeria Orrù, Edoardo Fiorillo, Antonella Mulas, Sandra Lai, Monia Lobina, Maria Grazia Piras, Matteo Floris, Maristella Steri, Marco Masala**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Eleonora Cocco, Jessica Frau, Lorena Lorefice, Marzia Fronza, Daniele Carmagnini,** *Università degli Studi di Cagliari, e Centro Regionale Sclerosi Multipla, Cagliari, Italia*  
**Roberto Zarbo,** *Scienze Mediche Chirurgiche E Sperimentali Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La vaccinazione di massa si è dimostrata lo strumento più efficace, sebbene non l'unico, per contrastare la pandemia da SARS-CoV-2, causa del Covid-19. Sono stati infatti sviluppati numerosi vaccini, in particolare una nuova classe a mRNA, che ha mostrato sia in fase sperimentale che nella sua applicazione su scala planetaria ottima efficacia, in particolare nel proteggere da malattia severa, ed eccellenti profili di sicurezza.

Un aspetto di grande rilevanza, che rappresenta l'oggetto principale della nostra ricerca, è la valutazione delle risposte al vaccino a mRNA nei pazienti con sclerosi multipla (SM) trattati con le cosiddette terapie modulanti la malattia (DMT). Infatti, nel contesto della campagna di vaccinazione in corso, i pazienti MS sottoposti a terapia con DMT, e in particolare quelli trattati con particolari farmaci – quali quelli che modulano il recettore della sfingosina-1-fosfato, e.g. fingolimod, o che agiscono contro un marcatore di superficie, il CD20, dei linfociti B, impoverendo queste cellule nel sangue e.g. ocrelizumab, rituximab – sono considerati come immunodepressi.

Per chiarire questi aspetti ci siamo posti i seguenti obiettivi:

- valutare lo sviluppo e il declino delle risposte immuni, umorali e cellulari in seguito a vaccinazione Sars-Cov-2 in relazione ai diversi regimi terapeutici seguiti dai pazienti SM e ad altre variabili quali sesso, età, severità di malattia, indice di massa corporea e fumo;
- valutare l'effetto delle risposte immuni rispetto al rischio di infezione, malattia manifesta e malattia severa da Sars-Cov-2 e al tempo stesso valutare l'effetto di infezioni intercorrenti da Sars-Cov-2 sulle risposte immuni;
- identificare se fattori genetici influenzino lo sviluppo, la durata e il declino della risposta immunitaria cellulare e umorale contro il vaccino Sars-Cov-2 nei pazienti con SM.

## RISULTATI

Nei primi sei mesi del progetto, per valutare l'impatto delle varie DMTs sulla risposta immunitaria in seguito a vaccino anti Sars-Cov-2 – sia umorale che cellulare – abbiamo effettuato oltre 900 prelievi ematici in pazienti con SM per estrarre il DNA, ottenere aliquote di siero e purificare le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) a di-

versi tempi: immediatamente prima della somministrazione della prima dose di vaccino BNT162b2 (T0), 30 giorni dopo la seconda dose (T1), 180 giorni dopo la seconda dose (T2), e 30 giorni dopo la terza dose (T3). Inoltre, di ogni paziente sono stati raccolti i dati demografici, clinici e ambientali.

Inizialmente, abbiamo valutato le risposte umorali generate dai vaccini al tempo T1 in 912 pazienti sardi con SM e 63 controlli sani, utilizzando la sierologia basata sulla produzione di anticorpi contro la proteina Spike (anti-S). L'infezione naturale da SARS-CoV-2 è stata valutata con un saggio diretto atto a identificare anticorpi contro la proteina del nucleocapside (N) (anti-N). Tra i 912 pazienti MS analizzati abbiamo identificato 38 positivi per la proteina N, suggerendo una pregressa infezione. Di questi, 25 avevano un precedente test molecolare (RT-qPCR) positivo e 22 risultavano positivi agli anticorpi anti-N già al momento della loro prima dose di vaccino.

Nel campione SM da noi analizzato i pazienti erano non trattati o nella maggior parte dei casi in trattamento con una delle 13 differenti DMTs analizzate nel nostro lavoro. La significatività delle differenze tra gruppi di pazienti stratificati per DMTs è stata calcolata con un modello lineare generalizzato. I dati demografici, clinici e il fumo sono stati analizzati come ulteriori fattori che potenzialmente influenzano l'immunità umorale dal vaccino Covid-19.

I risultati hanno mostrato che non ci sono differenze nella risposta anticorpale indotta dal vaccino tra i pazienti non trattati e i controlli sani. In linea con altri lavori, abbiamo trovato una differenza sostanziale per alcuni trattamenti. I pazienti SM trattati con natalizumab, teriflunomide, azatioprina, fingolimod, ocrelizumab e rituximab hanno mostrato risposte umorali significativamente inferiori rispetto ai pazienti non trattati con alcuna terapia. Non abbiamo invece osservato una differenza statisticamente significa-

tiva nella risposta tra i pazienti trattati con altri farmaci analizzati (dimetil fumarato, interferone, alemtuzumab e glatiramer acetato) e i pazienti non trattati.

Inoltre, l'età più avanzata, il sesso maschile e il fumo erano significativamente associati a una diminuzione dei titoli anticorpali contro la SARS-CoV-2. I pazienti SM precedentemente infettati da SARS-CoV-2 mostravano risposte umorali al vaccino significativamente più alte rispetto ai pazienti che non avevano contratto il virus.

Al momento stiamo analizzando le risposte anticorpali anti-S e anti-N contro il virus SARS-CoV-2 nei tempi T2 e T3. In parallelo, per valutare la risposta cellulare nei pazienti SM mediante citofluorimetria, abbiamo impostato un pannello ibrido T/B e un pannello B specifico. Il pannello ibrido T-B è stato ottimizzato per identificare l'attivazione delle cellule T e B dopo stimolazione con un pool di peptidi spike virali. Il pannello B specifico permetterà invece di identificare le cellule B specifiche di Sars-Cov-2. Utilizzando i pannelli descritti, eseguiremo esperimenti citofluorimetrici in PBMCs di un sottoinsieme di individui disponibili ai tempi T0, T1, T2 e T3 e sottoposti a terapia con diversi DMT.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sottolineano che la risposta umorale al vaccino BNT162b2 è significativamente influenzata dalla terapia specifica seguita dai pazienti, così come da altri fattori come la precedente e concomitante infezione da SARS-CoV-2, l'età, il sesso e lo stato di fumatore. Nel loro insieme, gli esperimenti completati e quelli in corso aiuteranno a definire le strategie ottimali per garantire un'efficace protezione immunitaria da Covid-19 e il regime terapeutico ottimale per la malattia autoimmune sottostante nei pazienti con SM.

# Impact of genetic factors and drugs used in the treatment of multiple sclerosis on cellular and humoral immune responses after vaccination against Sars-Cov-2: a pilot study in Sardinia

## INTRODUCTION AND AIMS

Mass vaccination has proven to be the most effective tool, although not the only one, to fight the SARS-CoV-2 pandemic, the cause of Covid-19. In fact, several vaccines have been developed, in particular a new class of mRNA vaccines, which have shown both in clinical trials and in the real-world excellent efficacy, in particular in protecting from severe disease, and excellent safety profiles. An aspect of great importance, which represents the main

topic of our Sars-Cov-2 research, is the evaluation of responses to the vaccine in patients with multiple sclerosis (MS) treated with so-called disease modulating therapies (DMT). In fact, in the context of the current vaccination campaign, MS patients undergoing DMT therapy, and in particular those treated with particular drugs – such as those that modulate the sphingosine-1-phosphate receptor, e.g. fingolimod, or that act against a surface marker, CD20, of B lymphocytes, depleting these cells in the blo-

od e.g. ocrelizumab, rituximab – are considered as immunocompromised.

To pursue these issues, we have set the following goals:

- to evaluate the development and decline of immune, humoral and cellular, responses following Sars-Cov-2 vaccination in relation to the different therapeutic regimens followed by MS patients and other variables such as gender, age, disease severity, body mass index and smoking;
- to evaluate the effect of immune responses with respect to the risk of infection, overt disease and severe disease by Sars-Cov-2 and at the same time evaluate the effect of intercurrent Sars-Cov-2 infections on immune responses;
- to identify whether genetic factors influence the development, duration, and decline of cellular and humoral immune responses against Sars-Cov-2 vaccine in MS patients.

This information can help to clarify the optimal Sars-Cov-2 vaccination strategies in different groups of MS patients.

## RESULTS

In the work done thus far we analyzed the humoral response after vaccination with BNT162b2 in a sample of 912 Sardinian MS patients at different time: before the BNT162b2 vaccine (T0), 30 days after the second dose (T1), 180 days after the second dose (T2), and 30 days after the third dose (T3). Also, the demographic, clinical and environmental data are collected.

As recently reported in (Pitzalis, Idda, et al. 2021) we initially assessed the humoral responses against SARS-CoV-2 at T1 (912 Sardinian MS patients and 63 healthy controls) using anti-Spike (S) protein-based serology. Previous and intercurrent SARS-CoV-2 infection was assessed by anti-Nucleocapsid (N) serology. Among the 912 MS patients analyzed we found 38 positives for the N protein, suggesting a previous infection. Of these, 25 had previous record of positive RT-PCR tests on respiratory samples and 22 were found positive to anti-N antibodies at the time of their first vaccine dose.

Patients were either untreated or undergoing treatment with a total of 13 different DMTs. Differences between treatment groups were assessed by generalized line-

ar mixed-effects model. Demographic, clinical data and smoking status were analyzed as additional factors potentially influencing humoral immunity of the Covid-19 vaccine.

Results showed that there is no difference in vaccine-induced antibody response between untreated patients and healthy controls. In line with previous results, we found a substantial difference in antibodies production for some treatments.

MS patients treated with natalizumab, teriflunomide, azathioprine, fingolimod, ocrelizumab, and rituximab showed significantly lower humoral responses compared to untreated patients. We did not observe a statistically significant difference in response between patients treated with the other drugs (dimethyl fumarate, interferon, alemtuzumab and glatiramer acetate) and untreated patients.

In addition, older age, male, sex and active smoking were significantly associated with lower antibody titers against SARS-CoV-2. MS patients previously infected with SARS-CoV-2 had significantly higher humoral responses to vaccine than uninfected patients.

We are now measuring anti S and anti N antibody responses against SARS-CoV-2 in T2 and T3. In parallel, to evaluate cellular response in MS patients by cytofluorimetry, we set a hybrid T/G panel and a B specific panel. The hybrid T-B panel is optimized to identify T and B activation following stimulation with a pool of viral spike peptides. The specific B panel will allow identification of Sars-Cov-2 specific B cells.

We are ready to perform cytofluorimetry experiments in PBMC samples from a subset of MS patients enrolled at T0, T1, T2 and T3 and undergoing different DMTs.

## CONCLUSIONS

Our results highlight that the humoral response to the BNT162b2 vaccine is significantly influenced by the specific therapy followed by the patients, as well as by other factors such as previous SARS-CoV-2 infection, age, gender and smoking status. Overall, the completed and ongoing experiments will help define the optimal strategies to ensure effective immune protection from Covid-19 and the optimal therapeutic regimen for underlying autoimmune disease in MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pitzalis M, Idda ML, Lodde V, Loizedda A, Lobina M, Zoledziewska M, Viridis F, Delogu G, Pirinu F, Marini MG, Mingoia M, Frau J, Lorefice L, Fronza M, Carmagnini D, Carta E, Orrù V, Uzzau S, Solla P, Loi F, Devoto M, Steri M, Fiorillo E, Floris M, Zarbo IR, Cocco E, Cucca F. Effect of Different Disease-Modifying Therapies on Humoral Response to BNT162b2 Vaccine in Sardinian Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2021 Dec 9;12:781843. doi: 10.3389/fimmu.2021.781843

**Progetto Speciale di ricerca FISM finanziato nel 2021 e l'ammontare di 50.000 €**  
FISM Research special project funded in 2021 and the amount of 50,000 €

# Restrizione calorica come nuovo approccio terapeutico per manipolare l'immunità e per migliorare il potenziale terapeutico di farmaci di prima linea nella sclerosi multipla recidivante-remittente



## Giuseppe Matarese\*, Luca Battistini\*\*

\*Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IEOS-CNR) c/o Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

\*\*IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Vincenzo Brescia Morra, Roberta Lanzillo**, Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Ciro Florio, Giorgia Teresa Maniscalco**, Centro Regionale per la diagnosi e cura della Sclerosi Multipla - AOU "Antonio Cardarelli", Napoli, Italia

**Diego Centonze**, Istituto Neurologico Mediterraneo, Neuromed, Pozzilli (IS), Italia

**Claudio Gasperini**, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale S. Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Marco Salvetti**, Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Diversi dati sperimentali hanno mostrato che esiste una forte relazione tra lo stato metabolico e la tolleranza immunologica verso gli antigeni self attraverso un controllo diretto esercitato sulle cellule del sistema immunitario da specifici sensori intracellulari dello stato nutritivo/energetico. Un aumento del "carico di lavoro metabolico" rappresenta un nuovo problema che collega il metabolismo alla perdita della tolleranza immunologica. Diversi farmaci sono stati approvati per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (SM-RR) e hanno dimostrato di ridurre i tassi di recidiva modulando le risposte immunitarie; tuttavia, il loro impatto sulla progressione della malattia a lungo termine e sull'accumulo della disabilità neurologica irreversibile rimane in gran parte poco chiaro, sottolineando la necessità di nuove strategie terapeutiche. In questo contesto, è stato dimostrato che sia il digiuno acuto che la restrizione calorica cronica sono in grado di migliorare l'encefalomielite sperimentale autoimmunitaria (ESA), il modello murino di SM. Nonostante questa evidenza, non sono stati condotti studi specifici per stabilire a livello cellulare il meccanismo d'azione della

restrizione calorica nel contesto dell'autoimmunità e della SM. Diversi dati suggeriscono che la rimozione di alimenti "pro-infiammatori" come il latte vaccino e il glutine dalla dieta è associata a cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale e alla riduzione dell'infiammazione nelle malattie autoimmunitarie, come la malattia infiammatoria cronica intestinale (IBD) e il diabete giovanile autoimmune. Inoltre, studi epidemiologici longitudinali hanno mostrato un'aumentata incidenza di SM nelle popolazioni con elevato consumo di prodotti a base di latte e derivati. Infine, è stato anche riportato che una dieta priva di glutine durante la gravidanza è in grado di prevenire lo sviluppo del diabete autoimmune in un modello animale di malattia. Sulla base di questi dati lo scopo del nostro progetto è capire se una lieve restrizione calorica con o senza la rimozione di alimenti specifici come il latte vaccino e il glutine è in grado di migliorare la progressione e l'attività della SM.

## RISULTATI

Ad oggi abbiamo incluso nello studio 60 soggetti con SM e siccome l'obiettivo principale dello studio è la valuta-

zione dell'effetto della restrizione calorica sulla progressione della SM, al momento dell'arruolamento, è stata effettuata una visita nutrizionale a ciascun paziente con SM e sviluppato un profilo nutrizionale specifico e personalizzato al fine di ridurre l'apporto calorico del soggetto (restrizione calorica del 15-20% rispetto alle calorie medie normalmente consumate) con o senza l'eliminazione di cibi altamente infiammatori (glutine e latte vaccino). Un gruppo di pazienti con SM è stato assegnato al gruppo di controllo che continua a seguire la normale alimentazione. Dopo l'arruolamento, è stato anche eseguito un prelievo di sangue da tutti i pazienti con SM inclusi nello studio per valutare la composizione e la percentuale delle diverse popolazioni del sistema immunitario e il numero e la funzione delle cellule T regolatorie, una sottopopolazione cellulare coinvolta nei meccanismi di tolleranza immunologica. I soggetti con SM vengono periodicamente monitorati dai nutrizionisti mediante impedenziometria per verificare l'aderenza al protocollo nutrizionale e ogni 6 mesi viene effettuato un prelievo di sangue per la valutazione degli effetti della restrizione calorica sull'assetto immuno-metabolico. Questo studio fa anche parte del progetto

MULTI-ACT per il coinvolgimento attivo dei pazienti con SM e del personale coinvolto nello studio (nutrizionisti, neurologi, ricercatori, psicologi, ecc.) nella ricerca connessa al progetto.

## CONCLUSIONI

Guidati dall'ipotesi che l'insorgenza delle malattie autoimmunitarie come la SM sia la conseguenza di un prolungato "carico metabolico" del sistema immunitario, l'obiettivo di questo progetto è migliorare la progressione della SM e l'efficacia dei trattamenti farmacologici di prima linea mediante restrizione calorica con o senza eliminazione di specifici alimenti altamente antigenici (glutine/latte) al fine di modulare lo stato metabolico dell'ospite. Questo progetto dovrebbe aiutare a ottenere nuove informazioni sulla patogenesi della SM e dovrebbe fornire le basi molecolari che spiegano, almeno in parte, il motivo della crescente prevalenza della SM nei paesi più sviluppati. Inoltre, i dati ottenuti da questo progetto potrebbero aiutare lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici basati su un approccio nutrizionale in grado di modulare la progressione e l'attività della SM.

# Calorie restriction as a novel therapeutic tool to manipulate immunity and improve therapeutic potential of first line drug treatments during relapsing remitting multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

There is a strong relationship between metabolic state and immunological self-tolerance through a direct control exerted on immune cells by specific intracellular nutrient-energy sensors. An increased "metabolic work load" represents a novel issue linking metabolism with loss of self-immune tolerance. Several disease-modifying drugs have been approved for Relapsing-remitting multiple sclerosis (RR-MS) treatments and have shown to reduce relapse rates by modulating immune responses; however, their impact on long-term disease progression and accrual of irreversible neurological disability remains largely unclear, underlining the need for novel therapeutic strategies. In this context, both acute fasting (AF) and chronic caloric restriction (CR) have been shown to improve experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the mouse model of MS. Despite this evidence, no specific studies have been performed to dissect at the cellular level the mechanism of action of CR in the context of autoimmunity and MS. Several data suggest that the removal of "pro-inflammatory" foods such as cow's milk and gluten

from diet is associated with changes in the composition of the intestinal microbiota and reduction of inflammation during autoimmune diseases, such as chronic inflammatory bowel disease (IBD) and autoimmune juvenile diabetes. In addition, longitudinal epidemiological studies have shown an increased incidence of MS in populations with high consumption of milk-based products and derivatives and the presence of antibodies against gluten in the blood of MS patients more frequently than in control patients. Finally, it has also been reported that a gluten-free diet during pregnancy is able to prevent the development of autoimmune diabetes in an animal model of disease. The aim of our project is to understand whether mild calorie restriction with or without removal of specific foods such as cow's milk and gluten is able to alter MS progression and activity.

## RESULTS

To date, we included in the study 60 MS patients and since the main objective of the study is the evaluation of the effect of calorie restriction on the progression of MS, at



enrolment, the nutritionists performed a nutritional visit to each MS subject and developed a specific and personalized nutritional profile in order to reduce subject's calorie intake (calorie restriction of 15-20% compared to the average calories normally consumed) with or without the removal of highly inflammatory foods (gluten and cow's milk). A group of MS patients was assigned to the control group who continue to follow the routine diet. After enrolment, it has been also performed a blood sampling from all MS patients included in the study to evaluate the composition and percentage of the different populations of the immune system and to study the number and function of Treg cells, a cellular subset involved in the control of immune tolerance. Patients with MS are monitored periodically by nutritionists by impedancemetry to verify adherence to the nutritional protocol and every 6 months is performed a blood sampling for the evaluation of the effects of calorie restriction on the immune-metabolic asset. This study is part of the Multiact project for the active involvement of MS patients and of personnel involved in

the study (nutritionists, neurologists, researchers, psychologists, etc.) in the research related to the project.

## CONCLUSIONS

Guided by the working hypothesis that the onset of autoimmune diseases such as MS is the consequence of a prolonged "metabolic overwork" of the immune system influenced by genetic and epigenetic factors, the aim of this project is to improve the outcome of MS and the efficacy of first line drug treatments via calorie restriction with or without removal of specific highly antigenic foods (gluten/milk) in order to modulate the metabolic state of the host. This project should help to obtain new information on the pathogenesis of MS and should provide the molecular basis explaining, at least in part, the reason for the growing prevalence of MS in the more developed countries. Furthermore, the data obtained from this project could help the development of new therapeutic protocols based on a nutritional approach capable of modulating the progression and activity of MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- de Candia P, Matarese G. The folate way to T cell fate. *Immunity*. 2022 Jan 11;55(1):1-3
- Di Silvestre D, Garavelli S, Procaccini C, Prattichizzo F, Passignani G, De Rosa V, Mauri P, Matarese G, de Candia P. CD4 + T-Cell Activation Prompts Suppressive Function by Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Oct 27;9:753884
- Feizi N, Focaccetti C, Pacella I, Tucci G, Rossi A, Costanza M, Pedotti R, Sidney J, Sette A, La Rocca C, Procaccini C, Matarese G, Barnaba V, Piconese S. CD8+ T cells specific for cryptic apoptosis-associated epitopes exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis*. 2021 Oct 29;12(11):1026
- de Candia P, Matarese G. Reimagining an immunological dogma. *Nat Immunol*. 2021 Oct 18
- Nardelli C, Granata I, Nunziato M, Setaro M, Carbone F, Zulli C, Piloni V, Capoluongo ED, De Palma GD, Corcione F, Matarese G, Salvatore F, Sacchetti L. 16S rRNA of Mucosal Colon Microbiome and CCL2 Circulating Levels Are Potential Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 4;22(19):10747
- Simula L, Antonucci Y, Scarpelli G, Cancila V, Colamatteo A, Manni S, De Angelis B, Quintarelli C, Procaccini C, Matarese G, Tripodo C, Campello S. PD-1-induced T cell exhaustion is controlled by a Drp1-dependent mechanism: Drp1-dependent mechanism. *Mol Oncol*. 2021 Sep 17
- De Vito F, Musella A, Fresegna D, Rizzo FR, Gentile A, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Buttari F, Procaccini C, Colamatteo A, Bullitta S, Guadalupi L, Caioli S, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Bruno A, Dolcetti E, Furlan R, Finardi A, Licursi V, Drulovic J, Pekmezovic T, Fusco C, Bruzzaniti S, Hornstein E, Uccelli A, Salvetti M, Matarese G, Centonze D, Mandolesi G. MiR-142-3p regulates synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2021 Sep 7
- Procaccini C, Garavelli S, Carbone F, Di Silvestre D, La Rocca C, Greco D, Colamatteo A, Lepore MT, Russo C, De Rosa G, Faicchia D, Prattichizzo F, Grossi S, Campomenosi P, Buttari F, Mauri P, Uccelli A, Salvetti M, Brescia Morra V, Vella D, Galgani M, Mottola M, Zuccarelli B, Lanzillo R, Maniscalco GT, Centonze D, de Candia P, Matarese G. Signals of pseudo-starvation unveil the amino acid transporter SLC7A11 as key determinant in the control of Treg cell proliferative potential. *Immunity*. 2021 May 11;51(5):1074-7613(21)00176-X
- Carbone F, Bruzzaniti S, Fusco C, Colamatteo A, Micillo T, De Candia P, Bonacina F, Norata GD, Matarese G. Metabolomics, Lipidomics, and Immunometabolism. *Methods Mol Biol*. 2021;2285:319-328
- de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Alviggi C, La Cava A, Matarese G. The pleiotropic roles of leptin in metabolism, immunity, and cancer. *J Exp Med*. 2021 May 3;218(5):e20191593





- Perna F, Bruzzaniti S, Piemonte E, Maddaloni V, Atripaldi L, Sale S, Sanduzzi A, Nicastro C, Pepe N, Bifulco M, Matarese G, Galgani M, Atripaldi L. Serum levels of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen associate with inflammatory status and disease severity in COVID-19 patients. *Clin Immunol*. 2021 Apr 2:108720
- Norata G, Matarese G. Novel acquisitions in cell immunometabolism. *Mol Aspects Med*. 2021 Feb 4:100945
- Palma C, La Rocca C, Gigantino V, Aquino G, Piccaro G, Di Silvestre D, Brambilla F, Rossi R, Bonacina F, Lepore MT, Audano M, Mitro N, Botti G, Bruzzaniti S, Fusco C, Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Alviggi C, Puca A, Grassi F, Rezzonico-Jost T, Norata GD, Mauri P, Netea MG, de Candia P, Matarese G. Caloric Restriction Promotes Immunometabolic Reprogramming Leading to Protection from Tuberculosis. *Cell Metab*. 2021 Jan 4:S1550-4131(20)30671-9
- de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Matarese G. T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol*. 2021 Jan;42(1):18-30
- Prattichizzo F, De Nigris V, Sabbatinelli J, Giuliani A, Castaño C, Párrizas M, Crespo I, Grimaldi A, Baranzini N, Spiga R, Mancuso E, Rippo MR, Procopio AD, Novials A, Bonfigli AR, Garavelli S, La Sala L, Matarese G, de Candia P, Olivieri F, Ceriello A. CD31 Positive-Extracellular Vesicles from Patients with Type 2 Diabetes Shuttle a miRNA Signature Associated with Cardiovascular Complications. *Diabetes*. 2021 Jan;70(1):240-254
- Horwitz DA, Liu A, Bickerton S, Castaldo G, Matarese G, Fahmy TM, La Cava A. Anti-CD2 Antibody-Coated Nanoparticles Containing IL-2 Induce NK Cells That Protect Lupus Mice via a TGF- $\beta$ -Dependent Mechanism. *Front Immunol*. 2020 Dec 16;11:583338
- Galgani M, Bruzzaniti S, La Rocca C, Micillo T, de Candia P, Bifulco M, Matarese G. Immunometabolism of regulatory T cells in cancer. *Mol Aspects Med*. 2020 Nov 26:100936
- Bruzzaniti S, Cirillo E, Prencipe R, Giardino G, Lepore MT, Garziano F, Perna F, Procaccini C, Mascolo L, Pagano C, Fattorusso V, Mozzillo E, Bifulco M, Matarese G, Franzese A, Pignata C, Galgani M. CD4+ T Cell Defects in a Mulibrey Patient With Specific TRIM37 Mutations. *Front Immunol*. 2020 Sep 18;11:1742
- Procaccini C, Matarese G. Where Mitochondria Meet Autoimmunity: The Treg Cell Link. *Cell Metab*. 2020 Oct 6;32(4):507-509
- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Simonelli I, Gilio L, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Visconti A, Paolillo A, Storto M, Gambardella S, Ferese R, Salvetti M, Uccelli A, Matarese G, Centonze D, De Vito F. A Single Nucleotide ADA Genetic Variant Is Associated to Central Inflammation and Clinical Presentation in MS: Implications for Cladribine Treatment. *Genes (Basel)*. 2020 Sep 30;11(10):E1152
- Galgani M, Bruzzaniti S, Matarese G. Immunometabolism and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2020 Aug 8;67:10-17
- Li X, Colamatteo A, Kalafati L, Kajikawa T, Wang H, Lim JH, Bdeir K, Chung KJ, Yu X, Fusco C, Porcellini A, De Simone S, Matarese G, Chavakis T, De Rosa V, Hajishengallis G. The DEL-1- $\alpha$ 3 integrin axis promotes regulatory T cell responses during inflammation resolution. *J Clin Invest*. 2020 Aug 20:137530
- Garavelli S, Bruzzaniti S, Tagliabue E, Di Silvestre D, Prattichizzo F, Mozzillo E, Fattorusso V, La Sala L, Ceriello A, Puca AA, Mauri P, Strollo R, Marigliano M, Maffei C, Petrelli A, Bosi E, Franzese A, Galgani M, Matarese G, de Candia P. Plasma circulating miR-23~27~24 clusters correlate with the immunometabolic derangement and predict C-peptide loss in children with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2020 Jul 29
- Vuotto C, Battistini L, Caltagirone C, Borsellino G. Neuroscientist. Gut Microbiota and Disorders of the Central Nervous System. 2020 Oct- Dec;26(5-6):487-502. doi: 10.1177/1073858420918826. Epub 2020 May 22
- Guerrera G, Ruggieri S, Picozza M, Piras E, Gargano F, Placido R, Gasperini C, Salvetti M, Buscarinu MC, Battistini L, Borsellino G, Angelini DF. EBV- specific CD8 T lymphocytes and B cells during glatiramer acetate therapy in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Aug 17;7(6):e876
- Kunkl M, Amormino C, Frasca S, Sambucci M, De Bardi M, Caristi S, Arcieri S, Battistini L, Tuosto L. CD28 Autonomous Signaling Orchestrates IL-22 Expression and IL-22-Regulated Epithelial Barrier Functions in Human T Lymphocytes. *Front Immunol*. 2020 Oct 14;11:590964
- Di Rita A, Angelini DF, Maiorino T, Caputo V, Cascella R, Kumar M, Tiberti M, Lambrughini M, Wesch N, Löhr F, Dötsch V, Carinci M, D'Acunzo P, Chiurchiù V, Papaleo E, Rogov VV, Giardina E, Battistini L, Strappazzon F. Characterization of a natural variant of human NDP52 and its functional consequences on mitophagy. *Cell Death Differ*. 2021 Mar 15. doi: 10.1038/s41418-021-00766-3

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2018 e l'ammontare di € 254.582**

FISM Research special project funded in 2018 and an amount of € 254,582

# Vaccino con bacillo di Calmette-Guérin nella sindrome radiologicamente isolata



## Giovanni Ristori

*CENTERS, Ospedale S. Andrea, Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Giovanni Ristori, Marco Salvetti, CENTERS, Ospedale S. Andrea, Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia**

**Maria Pia Amato, Dipartimento NEUROFARBA, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia**

**Giuseppe Matarese, (IEOS-CNR) c/o Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli IEOS - CNR, Napoli, Italia**

**Nicola De Stefano, Laboratorio di Neuroimmagini Quantitative, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia**

**Maria Pia Sormani, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia**

*Besides the proposing institutions other 23 MS Centers were identified and involved in recruitment process*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nell'ultima decade si è assistito a un importante progresso nella disponibilità di farmaci capaci di modificare il decorso della sclerosi multipla (SM). Nonostante ciò, per i pazienti rimangono problemi legati alla qualità della vita e al rischio di super trattamento. Approcci sicuri che possono essere utilizzati dall'inizio (biologico) della malattia, senza importanti rischi di effetti collaterali, non sono ancora alla nostra portata.

Il vaccino contenente Bacille Calmette-Guérin (BCG) può avere queste caratteristiche poiché è risultato avere un effetto benefico in pazienti con SM precoce e primo episodio demielinizzante. Essendo sicuro, economico e di facile utilizzo, noi proponiamo il suo uso per prevenire la progressione del processo demielinizzante in soggetti con sindrome radiologicamente isolata (RIS: persone asintomatiche con quadro di risonanza magnetica del sistema nevoso centrale suggestiva di SM). Sarà condotto uno studio multicentrico, in doppio cieco, controllato con placebo. Cento persone con RIS verranno randomizzate in due gruppi: 50 riceveranno una singola dose di BCG and 50 una singola dose di placebo. I due gruppi saranno sottoposti alle seguenti procedure alla baseline a differenti punti di tempo:

- Status clinico, scale MSFC, e "symbol digit modality test", ogni sei mesi durante i 3 anni di follow-up

- Risonanza magnetica dell'encefalo con gadolinio ai mesi 6, 12, 24, 36
- Profilo immuno-metabolico, come descritto dal gruppo di Materese ai mesi 6, 12, 24, 36.

L'endpoint primario dello studio è il numero di lesioni "attive" in risonanza durante il follow-up. L'endpoint secondario è il tempo di occorrenza del primo evento clinico durante i 3 anni di follow-up. Saranno anche ottenuti altri endpoint secondari di risonanza magnetica dell'encefalo. Un'analisi multiparametrica verrà applicata per monitorare le variazioni nel profilo immuno-metabolico dei partecipanti allo studio prima e dopo vaccinazione con BCG. Verranno valutati la sicurezza e la fattibilità di questo approccio.

## RISULTATI

L'inizio del progetto è stato ritardato a causa dell'indisponibilità del vaccino BCG in concomitanza con l'approvazione del progetto. Dopo la disponibilità iniziale del vaccino BCG dalle fonti storiche (ceppi Pasteur e danesi), è diventato chiaro che il vaccino non sarebbe stato accessibile per uso sperimentale.

Così abbiamo realizzato con la CRO dello studio una ricerca nei Paesi europei (per evitare lunghe e costose procedure per ottenere il vaccino fuori dall'Europa) ed è stata

finalmente individuata un'azienda polacca. Mentre la procedura, peraltro lunga, per ottenere il ceppo polacco è stata implementata in collaborazione con il CRO e l'AISM, è stato compiuto uno sforzo a livello nazionale per includere i Centri per la SM disponibili dall'Italia per reclutare persone RIS. Questo è stato un passo importante data la rarità della condizione oggetto di studio.

Attualmente sono stati individuati 21 Centri in tutta Italia. Il dossier è stato presentato e accettato all'Osservatorio AIFA e al Comitato Etico del Centro che guida la sperimentazione che ha incluso 3 persone.

Il dossier è in corso di presentazione agli altri Centri individuati, previa predisposizione di un emendamento al protocollo.

## Bacille Calmette Guerin vaccine in radiologically isolated syndrome

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) witnessed relevant therapeutic progress in the last decade. This notwithstanding, safety, quality of life and overtreatment remain elements of strong concern for the patients. Safe and manageable therapies that can be used since the (biological) onset of the disease, without risk of overtreatment, are important unmet needs in MS. Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine may have these characteristics since it resulted beneficial in early MS and first demyelinating episodes. Being safe, cheap and handy, we propose to investigate its use to prevent progression of the demyelinating process in radiologically isolated syndrome (RIS: asymptomatic persons with brain MRI highly suggestive of MS). We will randomize 100 persons with RIS according to Okuda criteria, 50 to receive a single dose of BCG and 50 a single dose of placebo. The two groups will undergo the following procedures at baseline and different time points:

- Clinical status, including multiple sclerosis functional composite scale and symbol digit modality test, every 6 months for the 3-year follow-up
- MRI brain scan with gadolinium at months 6, 12, 24, 36
- Immune-metabolic profiling, as recently described by Matarese's group at months 6, 12, 24, 36.

The primary endpoint of the study will be the number of active lesions at MRI developed over one year. The MRI data analysis will be carried out at the Quantitative Neuroimaging Lab of the University of Siena. The secondary endpoint will be the time to the first clinical event over the 3 years' period. Exploratory MRI-based endpoints

(cortical lesions, brain volume changes, and magnetization transfer ratios) will be also considered for the 3-year follow up. A multiple parameter analysis will be applied to monitor changes in the immune-metabolic profiling before and after BCG. Safety and feasibility of this approach will be assessed.

### RESULTS

The start of the project was delayed because of the unavailability of the BCG vaccine just concomitantly to the project approval. After initial availability from the historical sources (Pasteur and Danish strains) of BCG vaccine, it became clear that the vaccine would not be accessible for experimental use. So we implemented in collaboration with the study CRO a research in European countries (to avoid long and expensive procedures to obtain the vaccine outside Europe) and a Polish firm was at last identified. While the anyway long procedure to obtain the Polish strain was implemented in collaboration with the CRO and AISM, a nationwide effort was carried out to include available MS Centers from Italy to recruit RIS people. That was an important step given the rarity of the condition under study. Currently twenty-one Centers were identified all over Italy.

The dossier has been submitted and accepted to AIFA Osservatorio and the PI's Ethic Committee. The PI's Center has included 3 people.

The dossier is being submitted to the other Centers identified, after the preparation of a protocol's amendment.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Ristori G, Faustman D, Matarese G, Romano S, Salvetti M. *Bridging the gap between vaccination with Bacille Calmette-Guérin (BCG) and immunological tolerance: the cases of type 1 diabetes and multiple sclerosis. Curr Opin Immunol. 2018 Dec;55:89-96*

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 279.959 €**  
FISM Research special project funded in 2017 and the amount of € 279,959

# Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasmissibili, prevenibili da vaccino, e sicurezza dei vaccini, in una coorte di pazienti con sclerosi multipla. Studio multicentrico italiano



## Monica Ulivelli

Università di Siena, Siena, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Daiana Bezzini**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Marco Capobianco**, AOUS San Luigi, Orbassano (TO), Italia

**Marco Salvetti**, Università La Sapienza Roma, Roma, Italia

**Francesco Patti**, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

**Alice Laroni**, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

**Claudio Gasperini**, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma, Italia

**Viviana Nociti**, Fondazione Policlinico Universitario 'A. Gemelli' Roma, Italia

**Maria Pia Amato**, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

**Diego Centonze**, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo, NEUROMED Pozzilli (IS), Italia

**Luca Massacesi**, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

**Alessandra Lugaresi**, Ospedale Bellaria, Bologna, Italia

**Roberta Lanzillo**, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Benedetta Calchetti**, Ospedale San Donato, Arezzo, Italia

**Maria Letizia Bartolozzi**, Ospedale San Giuseppe, Empoli, Italia

**Giuseppe Meucci**, Presidio ospedaliero di Livorno, Livorno, Italia

**Mario Falcini**, Ospedale Misericordia e Dolce, Prato, Italia

**Katrin Plewnia**, Ospedale della Misericordia, Grosseto, Italia

**Gino Volpi**, Ospedale San Jacopo, Pistoia, Italia

**Nicola De Stefano**, Università di Siena, Siena, Italia

**Cristina Frittelli**, Ospedale Felice Lotti, Pontedera, Italia

**Fioravante Capone**, Università Campus Bio-Medico, Roma, Italia

**Maura Pugliatti**, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia

**Livia Pasquali**, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le persone con SM possono avere una maggiore suscettibilità alle infezioni rispetto alla popolazione generale, correlata al grado di disabilità o all'uso di farmaci ad attività immunosoppressiva. L'uso di questi farmaci richiede una certa attenzione sulla possibilità di eventi infettivi. Inoltre, alcuni agenti infettivi possono scatenare ricadute della malattia. Per questo motivo, la conoscenza dello stato di suscettibilità alle infezioni dei pazienti è necessaria ai fini di una corretta scelta terapeutica ma anche per stimolare

i decisori politici in campo sanitario a valutare la necessità o meno di una campagna di vaccinazioni diretta alle persone con SM. Risulta inoltre essenziale per stabilire una corretta programmazione delle vaccinazioni, che andrebbero effettuate prima di una terapia immunosoppressiva. Nonostante queste considerazioni, non ci sono dati disponibili sulla prevalenza dei pazienti suscettibili alle infezioni, considerando sia le persone non vaccinate sia quelle mai esposte all'infezione naturale. La sicurezza di molti vaccini nelle persone con SM è stata solo in parte investigata e i

dati sulla loro correlazione con un aumentato rischio di ricadute sono discordanti e non disponibili per tutte le vaccinazioni. In aggiunta, i pochi studi che suggeriscono una possibile correlazione sono stati spesso condotti su campioni di piccole dimensioni o su sottogruppi con caratteristiche specifiche. La carenza di dati informativi riguardanti la sicurezza dei vaccini nella popolazione di persone con SM preclude la possibilità di offrire nette raccomandazioni sul loro utilizzo in questi pazienti, nonostante l'importanza nella pratica clinica.

Gli scopi di questo studio sono: 1) valutare lo stato di immunizzazione, indotto dalla malattia naturale o dalla vaccinazione, contro i principali agenti infettivi prevenibili dai vaccini disponibili; 2) valutare la sicurezza della maggior parte dei vaccini utilizzati nella pratica clinica tramite la registrazione delle ricadute o della progressione della malattia come evento avverso del vaccino nel periodo di rischio definito, e confrontando il tasso di ricadute annuo prima e dopo vaccinazione.

Lo studio, con durata di 3 anni, è concepito come multicentrico, osservazionale, retrospettivo e prospettico. È previsto l'arruolamento di una coorte di 3.000 persone con SM attraverso l'utilizzo di database di 25 Centri clinici dislocati nell'Italia settentrionale, centrale e meridionale. Saranno arruolati tutti i pazienti con nuova diagnosi di SM recidivante remittente, secondo i criteri di Polman del 2010/17, da gennaio 2011 a dicembre 2021. I dati sull'immunizzazione naturale, e cioè il titolo degli anticorpi sierici specifici, saranno raccolti dalle cartelle cliniche dei centri, mentre i dati sui vaccini effettuati saranno recuperati dal libretto vaccinale.

Per studiare l'impatto dei vaccini sul rischio di ricaduta, saranno analizzati i dati sui pazienti vaccinati durante la malattia. Sarà monitorato un periodo da 2 fino a 6 mesi dopo il vaccino: il periodo di 2 mesi è considerato come periodo di massimo rischio clinico, mentre quello di 6 è l'estensione massima del periodo di rischio. Inoltre, in caso di recidiva, sarà quantificata la disabilità con la scala EDSS, confermata a 6 mesi dal vaccino. Questi dati potrebbero far luce sulla relazione tra vaccinazione e SM, aggiungendo nuove informazioni sulla loro sicurezza. Il comitato scientifico del Registro Italiano SM e patologie correlate ha approvato la richiesta di estrazione di dati riguardanti le caratteristiche

anagrafiche e di malattia dei pazienti arruolati nello studio e già inseriti nel Registro.

## RISULTATI

Lo studio ha subito un rallentamento a causa della difficoltà di arruolare pazienti e di reperire i libretti vaccinali durante la situazione pandemica.

Ad oggi, sono state comunque completate le schede di raccolta dati di circa 400 persone con SM e, su un campione di 103, afferenti al centro di Siena, sono state effettuate delle analisi preliminari. Dai dati di sierologia, si evince che oltre il 70% dei pazienti è stato sottoposto a screening per Citomegalovirus, Varicella Zoster, Herpes Virus 1 e 2 e Epstein Barr virus; circa metà del campione per i virus dell'epatite A, B e C, mentre meno del 30% per HIV, JC virus, morbillo e papilloma virus.

Analizzando la copertura vaccinale, le quote più elevate sono state osservate per poliomelite (92%), tetano e difterite (89%), seguite da epatite B (47%), pertosse (37%), rosolia (27%) e morbillo (24%). Da notare, però, che solo un terzo dei pazienti aveva eseguito il richiamo per il tetano, consigliato ogni 10 anni negli adulti. Per quanto riguarda le principali malattie prevenibili da vaccino, confrontando i dati sulle vaccinazioni effettuate, sulle malattie dichiarate dal paziente e quelli relativi alla sierologia, è emerso che per la varicella il 32% dei pazienti potrebbe essere potenzialmente suscettibile al virus, per il morbillo il 44%, per la rosolia il 65% e per la parotite il 68%.

Solo il 17% dei pazienti ha effettuato vaccinazioni dopo la diagnosi di SM. Viste le ridotte dimensioni del campione analizzato, non è stato ancora possibile valutare l'effetto delle vaccinazioni sull'attività o la progressione di malattia, in quanto in solo 1 paziente è stata registrata 1 ricaduta post vaccino.

## CONCLUSIONI

Da questi dati preliminari, si osserva una bassa immunizzazione, ancora insufficiente a rendere più facile e rapido l'accesso alle terapie modificanti il decorso. Questi risultati, anche se parziali, rafforzano la convinzione che l'informazione e le raccomandazioni sulle vaccinazioni siano parte fondamentale dell'assistenza medica nell'ambito di questa patologia.



# Immunisation status against major communicable diseases preventable with vaccines, and safety of vaccines, in a cohort of multiple sclerosis patients. An Italian multicenter study

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) patients maybe more susceptible to infections than the general population in relation to increasing disability or some specific therapies. The use of immunosuppressant or immunomodulatory drugs requires particular attention with respect to the possibility of occurrence of infectious events. Moreover, some infectious agents may trigger exacerbations of the disease. So, the knowledge of overall susceptibility to infections in patients is necessary for therapeutic decision-making and to help policy makers to assess the need of a vaccine campaign targeted to MS patients. In addition, it is essential to establish a correct timetable of vaccination in MS patients, especially before starting therapies with immunosuppressant drugs. Despite these considerations, there are no available data about the prevalence of MS patients susceptible to infections, considering those unvaccinated or never exposed to natural infections.

The safety of most of vaccines in MS patients has been partly investigated, and data on correlation between vaccination and increasing risk of relapses are still discordant or not available for some vaccines. In addition, the few studies that suggest a possible correlation are mostly carried out on small samples or on subgroups of patients with particular features. The deficiency of data regarding the vaccine safety in MS population precludes the possibility to offer clear-cut recommendations, despite the relevance of vaccinations in the clinical practice.

The aim of the current project on MS patients is twofold: 1) to assess immunisation status, due to past exposure to natural infectious diseases or vaccines, against major infectious agents preventable by available vaccines; 2) to assess the safety of most utilized vaccines in the clinical practice by recording relapses or disease progression as adverse event in the considered risk period after vaccination and using the annual relapse rate and its trend during the study period. The 3-year project is conceived as a multicenter, observational, both retro- and prospective study. A cohort of about 3,000 people with MS will be enrolled among databases of 25 clinical Centers in Northern, Central and Southern Italy. All patients diagnosed with relapsing remitting (RR) MS according to the 2010/2017 Polman's diagnostic criteria from January 2011 to December 2020 will be enrolled. Available data on natural immunization, expressed as specific serum antibodies titer, will be collected from the historical clinical records of Centers, whereas available data on vaccinations will be collected

from vaccination records. To study the impact of vaccines on the risk of relapse, data about patients receiving a vaccination during the disease course will be analyzed. The study follow-up period will range between 2-6 months after vaccination: the 2-month period is considered as the maximum clinical risk, whereas the 6 month-period as the maximal extension of risk in time. In addition, in the case of a clinical relapse, the variation of disability will be evaluated with EDSS scale confirmed at 6 months. These data might shed light on the relationship between vaccination and MS, adding new insights on their safety.

The Scientific Committee of the Italian MS Registry approved the request for extraction of data regarding the personal and disease characteristics of patients enrolled in the study and already included in the Registry.

## RESULTS

The study was slowed down due to the difficulty in enrolling patients and obtaining vaccination records during the pandemic situation.

To date, however, data collection form has been completed for about 400 people with MS and preliminary analyses have been carried out on a sample of 103 patients belonging to Siena center.

Serology data on this latter sample showed that more than 70% of patients were screened for Cytomegalovirus, Varicella Zoster, Herpes virus 1 and 2 and Epstein Barr virus; about a half of the sample for hepatitis A, B and C viruses, and less than 30% for HIV, JC virus, measles and Human Papilloma Virus.

Analysing vaccination coverage, the highest rates were observed for polio (92%), tetanus and diphtheria (89%), followed by hepatitis B (47%), pertussis (37%), rubella (27%) and measles (24%). It should be noted, however, that only one third of patients had received a tetanus booster, which is recommended every 10 years in adults. With regard to the main vaccine-preventable diseases, comparing data on vaccination, patient-reported diseases and serology, we observed that for chickenpox 32% of patients could potentially be susceptible to the virus, for measles 44%, for rubella 65% and for mumps 68%.

Only 17% of patients were vaccinated after their MS diagnosis. In view of the small sample size, it was not yet possible to evaluate the effect of vaccinations on disease activity or progression, as only 1 patient experienced a relapse after vaccination.



## CONCLUSIONS

From these preliminary data, a low level of immunisation can be observed, which is still insufficient to an easy and fast access to disease-modifying therapies. These results,

even if partial, reinforce the belief that information and recommendations on vaccinations are a fundamental part of medical care in this pathology.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Bezzini D, Battaglia MA, Ulivelli M. Immunisation status against major diseases preventable with vaccines in multiple sclerosis patients. 16th World Congress on Public Health, Rome, 12-17 October 2020*

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 80.570,5 €**  
FISM Research special project funded in 2019 and the amount of € 80,570.5

# Validazione e studio funzionale di varianti genetiche implicate nella risposta alla terapia con fingolimod



## Federica Eva Esposito

Centro Sclerosi Multipla e Unità di Neurologia, Laboratorio di Genetica Umana delle Malattie Neurologiche, Istituto di Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Laura Ferrè, Elisabetta Mascia, Melissa Sorosina, Silvia Santoro, Ferdinando Clarelli, Lucia Moiola, Vittorio Martinelli, Massimo Filippi**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

**Giorgio Valentini**, Dipartimento di Informatica, Università di Milano, Italia  
**David Brassat, Roland Liblau, Béatrice Pignolet**, Ospedale Universitario di Tolosa, Francia  
**Philip De Jager**, Columbia University, New York, USA

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nell'ultimo decennio abbiamo assistito a un significativo aumento delle terapie disponibili per i pazienti con sclerosi multipla a ricadute e remissioni (SMRR). La risposta alle terapie è però altamente variabile da paziente a paziente, rendendo difficile l'identificazione del trattamento più adatto al singolo soggetto fin dalle primissime fasi della malattia. Ad oggi la risposta ai farmaci viene valutata in corso di terapia sulla base della comparsa di nuovi sintomi e/o nuove lesioni alla risonanza magnetica nucleare (RMN). In questo contesto si inserisce il nostro studio, che si propone di studiare il rapporto tra la componente genetica e la propensione a rispondere a un determinato trattamento. Tale approccio potrebbe portare a un avanzamento nella gestione del paziente con SM, verso un'ottimizzazione della terapia, permettendo di definire se un paziente risponderà in maniera adeguata al farmaco scelto in base anche al suo profilo genetico.

## RISULTATI

Un precedente studio condotto presso il nostro centro SM, sempre grazie al supporto di FISM, ha consentito di identificare dei marcatori genetici associati alla risposta al trattamento con fingolimod partendo da una coorte di 255 pazienti con SMRR. Al fine di validare i risultati precedentemente ottenuti, abbiamo arruolato un secondo gruppo di 98 pazienti SMRR italiani, trattati con fingolimod e seguiti per almeno 2 anni presso il Centro Sclerosi Multipla dell'Ospedale San Raffaele di Milano; abbiamo inoltre cre-

ato una collaborazione con il Prof. Philip De Jager, della Columbia University di New York, che ha contribuito al progetto con 136 pazienti americani seguiti presso il Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) e con il Prof. David Brassat, del Centro Ospedaliero Universitario di Tolosa (Tolosa, Francia), che ha contribuito con 81 pazienti SMRR francesi.

Un totale di 442 soggetti è stato incluso nello studio. I pazienti delle coorti coinvolte nel progetto sono stati classificati in base alla risposta alla terapia, considerando lo stato NEDA (No Evidence of Disease Activity). In particolare, sono stati classificati come NEDA i soggetti che non avevano ricadute cliniche, nuove lesioni o lesioni attive alla RM e progressione di malattia dopo 2 anni dall'inizio del trattamento. Come ulteriore parametro per valutare la risposta al trattamento, è stato considerato l'intervallo di tempo che intercorre tra l'inizio del trattamento e il verificarsi della prima ricaduta di malattia (TTFR).

I soggetti inclusi nello studio sono stati genotipizzati e oltre 600.000 varianti genetiche distribuite su tutto il genoma sono state testate; nessuna variante è risultata essere significativamente associata allo stato NEDA, mentre se si considera l'outcome TTFR abbiamo identificato tre varianti: rs9371376 ( $p=2.20 \times 10^{-8}$ ) sul cromosoma 6, rs185664173 ( $p=5.67 \times 10^{-7}$ ) sul cromosoma 19 e rs6124768 ( $p=1.42 \times 10^{-7}$ ) sul cromosoma 20.

Utilizzando le informazioni presenti in diversi database pubblici abbiamo approfondito le caratteristiche delle regioni del genoma in cui le varianti identificate mappano.

Queste ulteriori analisi hanno suggerito un loro possibile ruolo nella modulazione dell'espressione di alcuni geni, tra cui i più interessanti sono TIAM2, TFB1M e CD40. Per avvalorare questa ipotesi, abbiamo proceduto a un'analisi di colocalizzazione in cui è stata valutata la sovrapposizione dei segnali derivanti dalla nostra analisi di associazione con i dati di un database pubblico che raccoglie per ogni gene le varianti che ne modulano l'espressione; l'analisi ha confermato la modulazione dell'espressione di TIAM2 da parte di rs9371376 nel sangue periferico.

Basandoci su queste evidenze abbiamo deciso di confermare *in vitro* la diversa espressione di TIAM2 su cellule specifiche del sistema immunitario. Inoltre, in considerazione dell'importanza di CD40 a livello immunologico e anche del fatto che è un locus noto per essere associato alla suscettibilità per la SM, abbiamo deciso di validare a livello funzionale anche la diversa espressione di CD40 rispetto al genotipo. Infine, è in corso la valutazione dell'espressione dei geni sopra citati in seguito alla stimolazione con fingolimod e/o con uno stimolo proinfiammatorio. In parallelo all'analisi di associazione su tutto il genoma, grazie alla

collaborazione con il Prof. Giorgio Valentini dell'Università degli Studi di Milano, abbiamo utilizzato un approccio di machine learning per costruire un modello di predizione di risposta alla terapia con fingolimod. Nel presente progetto, avendo a disposizione tre coorti aggiuntive, abbiamo deciso di aggiornare il modello sviluppato in precedenza e di utilizzare delle coorti indipendenti per l'addestramento, la validazione e il test del modello predittivo sviluppato. La presente analisi ha permesso di identificare un set di dati clinici e genetici che hanno una discreta capacità predittiva (AUROC=0.71).

## CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio ha permesso di identificare dei possibili marcatori di risposta alla terapia con fingolimod; lo studio approfondito dell'effetto di questi marcatori potrebbe portare in futuro all'identificazione di meccanismi non ancora noti alla base della risposta al farmaco. Inoltre, grazie al presente studio è stato possibile sviluppare un modello predittivo con una moderata capacità di predizione della risposta a fingolimod.

# Validation and functional assessment of genetic variants implicated in the response to fingolimod treatment

## INTRODUCTION AND AIMS

Over the past decade, we have seen a significant increase in the therapies available for patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS). However, the response to therapies is highly unpredictable and varies from patient to patient, making it difficult to identify the most suitable treatment for each subject from the very early stages of the disease. Nowadays treatment response is evaluated during therapy and it is based on the appearance of new symptoms and/or new lesions on nuclear magnetic resonance imaging (MRI). The present study is aimed to assess the relationship between the genetic component and the propensity to respond to a treatment. This approach could lead to an improvement of the MS patient management, allowing to define if a patient will respond to the chosen drug based also on his genetic profile, in the context of a treatment optimization.

## RESULTS

A previous study conducted at our MS center, supported as well by FISM, allowed us to identify genetic markers associated to the response to fingolimod in a cohort of 255 patients with RRMS. In order to validate the previously

obtained results, we enrolled a second group of 98 Italian RRMS patients, treated with fingolimod and followed for at least 2 years at the Multiple Sclerosis Center of the San Raffaele Hospital in Milan; we also developed a collaboration with Prof. Philip De Jager, of Columbia University in New York, who contributed to the project with 136 American patients followed at the Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) and with Prof. David Brassat, of the University Hospital Center of Toulouse (Toulouse, France), who contributed with 81 French RRMS patients. A total of 442 subjects were included in the study. All the patients were classified based on response to therapy, considering the NEDA (No Evidence of Disease Activity) status. In particular, the subjects who did not have clinical relapses, new lesions or active lesions on MRI and disease progression after 2 years from treatment start were classified as NEDA. As an additional parameter to assess the response to treatment, the interval of time between the treatment start and the occurrence of the first relapse (TTFR) was considered.

The subjects included in the study were genotyped and over 600,000 genetic variants distributed throughout the genome were tested; none of them revealed to be signi-

ificantly associated with NEDA status, while for the TTR we identified three variants: rs9371376 ( $p= 2.20 \times 10^{-8}$ ) on chromosome 6, rs185664173 ( $p= 5.67 \times 10^{-7}$ ) on chromosome 19 and rs6124768 ( $p= 1.42 \times 10^{-7}$ ) on chromosome 20. Taking advantage of the availability of public databases, we tried to explore the characteristics of the regions of the genome where the identified variants mapped. These analyses suggested a possible role of the identified signals in modulating the expression of some genes, among which the most interesting are TIAM2, TFB1M and CD40.

To support this hypothesis, we performed a colocalization analysis in order to evaluate the overlap of the signals deriving from the association analysis with the data of a public database that collects for each gene the variants that modulate its expression; this analysis confirmed the role of modulation of rs9371376 in the expression of TIAM2 in blood.

Based on this evidence we decided to confirm *in vitro* the different expression of TIAM2 on specific cells of the immune system. In addition, given the importance of CD40 at the immunological level and the fact that it is a locus known to be associated with MS susceptibility, we decided to functionally validate also the different expression of CD40 according to the genotype. Finally, the asses-

sment of the expression of the above-mentioned genes in response to stimulation with fingolimod and/or a proinflammatory stimuli is ongoing. In parallel to the genome-wide association analysis, thanks to the collaboration with Prof. Giorgio Valentini of the University of Milan, a machine learning approach was used to build a prediction model of response to fingolimod. In the present project, given the availability of three additional cohorts, we decided to update the previously developed model and to use independent cohorts for the training, the validation and the testing of the developed predictive model. The present analysis allowed us to identify a set of clinical and genetic data that have a discrete predictive capacity (AUROC = 0.71).

## CONCLUSIONS

In conclusion, the present study allowed the identification of possible markers of response to fingolimod therapy; the in-depth study of the effect of these markers could lead, in the future, to the identification of mechanisms, not yet known, involved in fingolimod treatment response. Moreover, thanks to the present study we developed a predictive model with a moderate accuracy in the prediction of response to fingolimod.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Combining clinical and genetic data to predict response to fingolimod treatment in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis patients: a precision medicine approach. Manuscript in preparation*
- *7th European Academy of Neurology (EAN 2021), Virtual Conference June 19-22, 2021*
- *54th European Human Genetics Conference (ESHG 2021), Virtual Conference August 28-31, 2021*
- *WCN ROME 2021+ 25th WORLD CONGRESS OF NEUROLOGY, Fully Virtual, October 3-7, 2021*

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2021 e un ammontare di 50.000€**  
FISM Research special project funded in 2021 and the amount of € 50,000



# **DATA SHARING**

## DATA SHARING



---

# **Registro Italiano sclerosi multipla e patologie correlate**

Multiple Sclerosis  
Italian Register  
and related disorders

---

# Indice / Index

---

## REGISTRO ITALIANO SCLEROSI MULTIPLA E PATOLOGIE CORRELATE MULTIPLE SCLEROSIS ITALIAN REGISTER AND RELATED DISORDERS

### Progetti terminati / Ended projects

<b>Introduzione / Introduction</b>	<b>180</b>
<b>Epidemiologia Descrittiva / Descriptive Epidemiology</b>	<b>182</b>
<b>Maria Pia Amato</b> <b>Progressione silente in una coorte Italiana di pazienti con CIS e SM recidivante-remittente</b> Silent progression in an Italian cohort of CIS and Relapsing-Remitting MS patients	<b>182</b>
<b>Maria Trojano</b> <b>Fattori demografici, clinici e terapeutici associati al rischio e alla severità di Covid-19 in persone con sclerosi multipla</b> Demographic, clinical and treatment factors associated with the risk and severity of Covid-19 in people with multiple sclerosis	<b>185</b>
<b>Roberto Bergamaschi</b> <b>Studio ETEROGENEITÀ. L'espressione fenotipica della sclerosi multipla (SM) può essere condizionata dalle caratteristiche del centro SM di riferimento?</b> HETEROGENEITY Study. Are multiple sclerosis (MS) phenotypes influenced by the type of referral MS center?	<b>189</b>
<b>Lorena Lorefice</b> <b>Caratterizzazione clinica ed evoluzione della Sclerosi Multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo</b> Clinical characteristics and disease outcomes of late onset Multiple Sclerosis: a retrospective multicenter study	<b>191</b>
<b>Ottimizzazione delle terapie / Therapy optimization</b>	<b>194</b>
<b>Francesco Patti</b> <b>Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real world life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano</b> Clinical effectiveness of different Natalizumab interval dosing schedules in a large Italian population of patients with multiple sclerosis	<b>194</b>
<b>Emanuele D'Amico</b> <b>Il fenotipo e il recupero delle ricadute nei pazienti con Sclerosi Multipla Recidivante Remittente: vecchie e nuove terapie modificanti il decorso a confronto</b> First relapse phenotype and recovery in naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients undergoing old and new disease modifying therapies: an Italian Registry study	<b>198</b>



<b>Emanuele D'Amico</b> <b>Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico</b> Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study	<b>201</b>
<b>Progetti approvati Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate</b> Multiple Sclerosis Italian Register and related disorders approved projects	<b>204</b>
<b>Comitato Scientifico del Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate</b> Italian MS Registry and related disorders Scientific Committee	<b>208</b>

Il Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate è realizzato con il contributo di FISM, 5permille e donazioni, e delle aziende:

*The Italian Multiple Sclerosis Registry and related disorders is supported by the contribution of FISM, the Italian "5x1000" Income tax, donations, and the following companies:*



# Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate

Il Registro italiano di Sclerosi Multipla è uno dei Progetti Speciali di punta della ricerca sostenuta da AISM e dalla sua Fondazione che è stato avviato con l'obiettivo di creare una infrastruttura organizzata multicentrica per raccogliere i dati di tutti i pazienti con sclerosi multipla seguiti nei diversi centri sclerosi multipla (SM) italiani.

Nel 2015 è stata ufficialmente lanciata una Unità di ricerca specifica per il Registro Italiano SM, nata sulla base di un Accordo di Programma firmato nel 2014 tra FISM e l'Università degli Studi di Bari (centro coordinatore del più grande database clinico italiano sulla SM).

Oltre 161 Centri clinici Italiani hanno aderito al progetto e ad oggi, il Registro Italiano SM raccoglie i dati demografici e clinici di oltre 74.000 persone seguite dai Centri clinici italiani. Dal 2021, per una maggiore inclusività, il progetto ha modificato il suo nome in "Registro Italiano SM e Patologie Correlate", in questo modo potranno essere raccolti anche i dati di altre malattie demielinizzanti e disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD), come la neuromielite ottica e le patologie associate alla presenza di anticorpi anti-MOG (MOGAD).

Il Registro è dunque pronto a diventare un vero strumento di ricerca scientifica che può essere utile per lo sviluppo di studi epidemiologici e clinici oltre ad essere un valido strumento per la programmazione sanitaria promuovendo l'equità di accesso alle cure attraverso il confronto delle pratiche assistenziali dei diversi centri nonché studiando/valutando politiche assistenziali di carattere nazionale e locale.

**Il Comitato scientifico del Progetto Registro Italiano SM ha individuato due linee di ricerca strategica prioritarie:**

## 1. PROGETTI IN SANITÀ PUBBLICA

Necessità di impostare un censimento universale dei pazienti che venga aggiornato in maniera sistematica e continuativa allo scopo di ottenere stime precise di prevalenza e incidenza della malattia a livello regionale e nazionale per il perseguimento di finalità di prevenzione, diagnosi, cura, programmazione sanitaria, verifica della qualità delle cure e valutazione dell'assistenza sanitaria sul territorio italiano.

## 2. PROGETTI DI RICERCA

Necessità di raccogliere informazioni utili per la pianificazione di studi di ricerca per specifiche progettualità. In particolare studi di farmacovigilanza volti a identificare sicurezza, tollerabilità ed efficacia associata nel breve e lungo termine ai trattamenti immunosoppressivi e immunomodulanti, nonché studi su fattori prognostici e biomarcatori relativi alla progressione di malattia, alla risposta al trattamento e alla mortalità.

**La linea strategica dei progetti di ricerca comprende 3 aree di studio principali**

### Epidemiologia descrittiva

Studia la frequenza, la distribuzione e i determinanti della SM nella popolazione.

### Ottimizzazione della terapia

Studio e analisi delle terapie SM. Comprende tre ambiti di lavoro:

- Analisi sulle terapie
- Progetti specifici
- Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta alla terapia

### Forme rare di SM

Incentrato su diverse forme SM: forme benigne, RIS, CIS, PP, SM a esordio pediatrico, forme aggressive.

Attualmente sono stati attivi 43 progetti di ricerca nelle tre aree di studio della linea strategica di ricerca. In questo Compendio riportiamo una sintesi dei 6 progetti terminati nel 2021.

# Italian Multiple Sclerosis Register and related disorders

The Italian Multiple Sclerosis Registry is one of the main Research Special Projects supported by AISM and its Foundation, which was launched with the aim of creating a multicentric organized infrastructure to collect the data of all patients with multiple sclerosis followed in the various multiple sclerosis (MS) centers in Italy. In 2015 a specific Research Unit was launched for the Italian SM Registry, established on the basis of a Program Agreement signed between the Italian MS Foundation (FISM) and the University of Bari (coordinating center of the largest Italian MS clinical database) in 2014. Over 161 Italian clinical centers have joined the project and to date, the Italian MS Registry collects the demographic and clinical data of over 74,000 people in care by Italian clinical centers.

Since 2021, for greater inclusiveness, the project has changed its name to "Italian MS and Related Pathologies Register, thus data of other demyelinating diseases and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder such as neuromyelitis optica (NMOSD) and pathologies associated with the presence of anti-MOG antibodies (MOGAD) can be collected.

The Registry is therefore ready to become a true scientific research tool that can be useful for the development of epidemiological and clinical studies, as well as being a valid tool for health planning by promoting the equity of access to care by comparing the welfare practices of the different Centers and to study / evaluate national and local welfare policies.

**The Scientific Committee of the Italian Register SM Project has identified two strategic research priorities:**

## 1. PROJECTS IN PUBLIC HEALTH

Need to set up a universal census of patients that is systematic and continuous update, in order to obtain accurate estimates of prevalence and incidence of the disease at regional and national level for the pursuit of prevention, diagnosis, treatment, health planning, verification of the quality of care and assessment of health care in Italy.

## 2. RESEARCH PROJECTS

Need to gather useful information for the planning of research studies for specific projects. In particular, pharmacovigilance studies aimed at identifying the safety, tolerability and efficacy associated, in the short and long term, with immunosuppressive and immunomodulatory treatments, as well as studies on prognostic factors and biomarkers related to disease progression, response to treatment and mortality.

**The strategic research projects priorities include 3 main areas of study**

### Descriptive epidemiology

Studies the frequency, the distribution and the determinants of MS in populations.

### Therapy optimization

Study and analysis of MS therapies. Includes three areas of work:

- Analysis of therapies
- Specific projects
- Prognostic factors and predictive models of therapy response

### Rare forms of MS

Focus on the different MS forms: benign forms, RIS, CIS, PP, paediatrics MS onset, aggressive forms.

Currently 43 research projects have been active on the three main areas of the strategic research line. In this Compendium we reported the summary of the 6 projects completed in 2021

# Progressione silente in una coorte italiana di pazienti con CIS e SM recidivante-remittente



## Maria Pia Amato

*Dipartimento di NEUROFARBA, Università di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Emilio Portaccio, Angelo Bellinva, Mattia Fonderico, Luisa Pastò, Lorenzo Razzolini,**  
*Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia*

**Rocco Totaro,** *Ospedale San Salvatore, L'Aquila, Italia*

**Daniele Spitaleri,** *AORN San G. Moscati, Avellino, Italia*

**Alessandra Lugaresi,** *Università di Bologna, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche, Bologna, Italia*

**Eleonora Cocco,** *Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Marco Onofri,** *Università "G. D'Annunzio" Chieti - Pescara, Italia*

**Franco Di Palma,** *ASST Lariana Ospedale S. Anna, Como, Italia*

**Francesco Patti,** *Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

**Davide Maimone,** *Ospedale Garibaldi Centro, Catania, Italia*

**Paola Valentino,** *Umberto Aguglia, Università degli Studi di Catanzaro, Catanzaro, Italia*

**Paolo Confalonieri,** *IRCCS Istituto Neurologico Besta, Milano, Italia*

**Alessandra Protti,** *Ospedale Niguarda, Milano, Italia*

**Patrizia Sola,** *Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Italia*

**Giacomo Lus,** *Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli, Italia*

**Giorgia Teresa Maniscalco,** *Ospedale Cardarelli, Napoli, Italia*

**Vincenzo Brescia Morra,** *Università Federico II, Napoli, Italia*

**Giuseppe Salemi,** *Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia*

**Franco Granella,** *Università degli studi di Parma, Parma, Italia*

**Ilaria Pesci,** *Ospedale VAIO, Fidenza (PR), Italia*

**Roberto Bergamaschi,** *IRCCS Fondazione Mondino, Pavia Italia*

**Marika Vianello,** *Ospedale Ca' Fancello, Treviso, Italia*

**Vito Lepore,** *IRCCS Mario Negri, Milano, Italia*

**Massimo Filippi,** *Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, IRCCS San Raffaele, Milano, Italia*

**Maria Trojano,** *Pietro Iaffaldano Marta Simone, Università degli Studi di Bari, Bari, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'accumulo della disabilità nella sclerosi multipla può verificarsi come peggioramento associato alla ricaduta (relapse-associated worsening, RAW) o progressione indipendente dall'attività di ricaduta (progression independent of relapse activity, PIRA). Il ruolo del PIRA nei primi anni di malattia deve ancora essere stabilito. L'obiettivo di questo studio di coorte multicentrico, osservazionale e retrospettivo era di indagare il contributo di RAW e PIRA all'accumulo

di disabilità in pazienti con sindrome clinicamente isolata e sclerosi multipla recidivante-remittente precoce, valutato entro un anno dall'esordio e con follow-up  $> / = 5$  anni.

## RISULTATI

I dati sono stati estratti dal Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate. L'accumulo di disabilità confermato è stato definito da un aumento del punteggio della scala Expanded Disability Status Scale (EDSS) confermato

a 6 mesi e classificato per l'associazione temporale con le ricadute. I fattori associati al PIRA e al RAW sono stati valutati utilizzando l'analisi di sopravvivenza multivariata (regressione di Cox).

Sono stati reclutati in totale 5.169 pazienti. In un periodo di follow-up di 11,5 + 5,5 anni, PIRA si è verificato in 1.427 (27,6%) e RAW in 922 (17,8%) pazienti. PIRA era associato a una maggiore età al basale (HR=1,19; 95CI 1,13-1,25,  $p<0,001$ ), con un decorso recidivante-remittente al basale (HR=1,44; 95CI 1,28-1,61,  $p<0,001$ ), maggior durata di malattia al basale (HR=1,56; IC 95% 1,28-1,90,  $p<0,001$ ), minor punteggio EDSS al basale (HR=0,92; 95CI 0,88-0,96,  $p<0,001$ ), numero inferiore di recidive prima dell'evento (HR= 0,76; 95CI 0,73-0,80,  $p<0,001$ ). Il RAW era associato a un'età più giovane al basale (HR=0,87; 95CI 0,81-0,93,  $p<0,001$ ), con un decorso recidivante-remittente al basale (HR=1,55; 95CI 1,35-1,79,  $p<0,001$ ), un minor punteggio EDSS al basale (HR=0,94; 95CI 0,89-0,99,  $p=0,017$ ), numero maggiore di recidive prima dell'evento (HR=1,04; 95CI 1,01-1,07,  $p<0,001$ ). L'esposizione più lunga ai farmaci modificanti il decorso della malattia è stata associata a un rischio inferiore sia di PIRA che di RAW ( $p<0,001$ ). Durante il perio-

do di follow-up, 840 (16,3%) pazienti hanno soddisfatto la definizione algoritmica di SM secondaria progressiva (27,0% dei soggetti RAW e 41,4% dei soggetti PIRA). Concentrandosi sui pazienti con uno o più eventi di peggioramento della disabilità, il decorso progressivo secondario era associato a una maggiore età al basale (HR=1,28-1,31; 95CI 1,15-1,49,  $p<0,001$ ), un maggior punteggio EDSS al basale (HR=1,38- 48; 95CI 1,26-1,55,  $p<0,001$ ), numero inferiore di ricadute prima della transizione (HR=0,91; 95CI 0,85-0,96,  $p<0,001$ ) e una percentuale maggiore di eventi PIRA prima della transizione (HR=3,35; IC 95% 2,67- 4.22,  $p<0,001$ ).

## CONCLUSIONI

Questo studio fornisce la prova che in una coorte di pazienti con sclerosi multipla valutati nei primi anni di malattia, il PIRA ha contribuito in modo importante all'accumulo confermato della disabilità. I nostri risultati indicano che una progressione insidiosa appare anche nelle prime fasi della malattia, suggerendo che l'infiammazione e la neurodegenerazione possono rappresentare un unico continuum di malattia, in cui l'età è uno dei principali determinanti della fenomenologia della malattia.

# Silent progression in an Italian cohort of CIS and relapsing-remitting MS patients

## INTRODUCTION AND AIMS

Disability accrual in multiple sclerosis may occur as relapse-associated worsening (RAW) or progression independent of relapse activity (PIRA). The role of PIRA in early MS is yet to be established. The objective of this multicentre, observational, retrospective cohort study was to investigate the contribution of RAW and PIRA to confirmed disability accumulation in patients with clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis, assessed within one year from onset and with follow-up  $\geq$  5 years.

## RESULTS

Data were extracted from the Italian Multiple Sclerosis Register and related disorders. Confirmed disability accumulation was defined by an increase in Expanded Disability Status Scale score confirmed at 6 months, and classified per temporal association with relapses. Factors associated with progression independent of relapse activity and relapse-associated worsening were assessed using multivariable Cox regression models. A total of 5169 patients were recruited. Over a follow-up period of 11.5 + 5.5 years, PIRA occurred in 1.427 (27.6%) and RAW in 922 (17.8%) patients. PIRA was associated with older age

at baseline (HR=1.19; 95CI 1.13-1.25,  $p<0.001$ ), having a relapsing-remitting course at baseline (HR=1.44; 95CI 1.28-1.61,  $p<0.001$ ), longer disease duration at baseline (HR=1.56; 95%CI 1.28-1.90,  $p<0.001$ ), lower Expanded Disability Status Scale at baseline (HR=0.92; 95CI 0.88-0.96,  $p<0.001$ ), lower number of relapses before the event (HR=0.76; 95CI 0.73-0.80,  $p<0.001$ ). RAW was associated with younger age at baseline (HR=0.87; 95CI 0.81-0.93,  $p<0.001$ ), having a relapsing-remitting course at baseline (HR=1.55; 95CI 1.35-1.79,  $p<0.001$ ), lower Expanded Disability Status Scale at baseline (HR=0.94; 95CI 0.89-0.99,  $p=0.017$ ), higher number of relapses before the event (HR=1.04; 95CI 1.01-1.07,  $p<0.001$ ). Longer exposure to disease modifying drugs was associated with a lower risk of both PIRA and RAW ( $p<0.001$ ). Over the follow-up period, 840 (16.3%) patients fulfilled the algorithmic definition of secondary progressive MS (27.0% of RAW and 41.4% of PIRA subjects). Focusing on patients with one or more confirmed disability accrual, secondary progressive course was associated with older age at baseline (HR=1.28-1.31; 95CI 1.15-1.49,  $p<0.001$ ), higher expanded disability status scale at baseline (HR=1.38-48; 95CI 1.26-1.55,  $p<0.001$ ) lower number of relapses before transition (HR=0.91; 95CI 0.85-0.96,  $p<0.001$ )

and a higher proportion of PIRA events before transition (HR=3.35; 95%CI 2.67-4.22, p<0.001).

## CONCLUSIONS

This study provides evidence that in early relapsing-onset multiple sclerosis cohort, PIRA was an important contri-

butor to confirmed disability accumulation. Our findings indicate that insidious progression appears even in the earliest phases of the disease, suggesting that inflammation and neurodegeneration can represent a single disease continuum, in which age is one of the main determinants of disease phenomenology.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Portaccio E, et al. Progression independent of relapse activity in early multiple sclerosis patients. WCN 2021
- Portaccio E, et al. Progression independent of relapse activity in early multiple sclerosis patients and risk of secondary progression: an Italian multicentre study. ECTRIMS 2021
- Bellinva A, et al. Progression independent of relapse activity in paediatric, adult and late-onset multiple sclerosis patients. ECTRIMS 2021
- Fonderico M, et al. Relapse-associated worsening and progression independent of relapse activity in an Italian multicentre cohort of early multiple sclerosis patients. ECTRIMS 2021
- Portaccio E, et al. Progression is independent of relapse activity in early multiple sclerosis: a real-life cohort study. Brain, in press

# Fattori demografici, clinici e terapeutici associati al rischio e alla severità di Covid-19 in persone con sclerosi multipla



## Maria Trojano

*Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Pietro Iaffaldano, Alessia Manni, Damiano Paolicelli**

**Giuseppe Lucisano**, *Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari; Center for Outcomes Research and Clinical Epidemiology (CORESEARCH), Pescara, Italia*

**Maria Trojano**, *on behalf of the Italian MS Register*

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Francesco Patti, Simona Toscano**, *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, GF Ingrassia, Sezione Neuroscienze, Centro Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

**Marco Capobianco, Simona Malucchi**, *SCDO Neurologia e Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CRESM), AOU San Luigi - Orbassano (TO), Italia*

**Vincenzo Brescia Morra, Maria Petracca**, *Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

**Patrizia Sola**, *Centro malattie Demielinizzanti, Azienda Ospedaliera Universitaria di Modena/OCB, UO Neurologia; Modena, Italia*

**Ilaria Pesci**, *Centro SM UO Neurologia, Ospedale Di Vaio, Fidenza, AUSL PR, Fidenza, Italia*

**Giacomo Lus**, *Centro SM, II Divisione di Neurologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italia*

**Giovanna De Luca**, *Centro Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Policlinico SS. Annunziata, Chieti, Italia*

**Alessandra Lugaresi**, *IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, UOSI Riabilitazione Sclerosi Multipla, Bologna; Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna, Bologna, Italia*

**Paola Cavalla**, *Centro SM, Neurologia 1 D.U, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italia*

**Sara Montepietra**, *Centro SM, S.O.C. Neurologia, Arcispedale Santa Maria Nuova, AUSL-IRCCS Reggio Emilia, Italia*

**Giorgia Teresa Maniscalco**, *Ambulatorio Neurologico e Centro Sclerosi Multipla, Ospedale A Cardarelli, Napoli, Italia*

**Franco Granella**, *Centro Sclerosi Multipla - Azienda Ospedaliero-Universitaria degli Studi, di Parma, Parma, Italia*

**Paolo Ragonese**, *Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia*

**Marika Vianello**, *Centro Sclerosi Multipla UO Neurologia - Ospedale, Treviso, Italia*

**Laura Brambilla**, *Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "C. Besta" U.O. Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Milano, Italia*

**Rocco Totaro**, *Centro Malattie Demielinizzanti - Clinica Neurologica, Ospedale San Salvatore, L'Aquila, Italia*





**Massimo Filippi, Lucia Moliola**, Dipartimento di Neurologia, Neurofisiologia e Neuroriabilitazione, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

**Diana Ferraro**, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

**Paola Mosconi, Vito Lepore**, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano, Italia

**Michela Ponzio**, Area Ricerca Scientifica, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia

**Gioacchino Tedeschi**, Prima Divisione di Neurologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Centro di Ricerca MRI SUN-FISM, AOU, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Giancarlo Comi**, Istituto di Neurologia Sperimentale, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

**Mario Alberto Battaglia**, Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Italia

**Maria Pia Amato**, Dipartimento NEUROFARBA, Università di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sindrome respiratoria acuta associata al coronavirus 2 (SARS-CoV2 o Covid-19) si è rapidamente diffusa in tutto il mondo diventando una pandemia. C'è una grande richiesta di dati relativi all'impatto del virus sulle persone con sclerosi multipla (PcSM). Fino al 70% delle PcSM riceve terapie modificanti il decorso della malattia (DMT) che influenzano la risposta immunitaria; a loro volta, questi farmaci possono esporre il paziente a un rischio maggiore di sviluppare Covid-19 e sperimentare esiti Covid-19 peggiori rispetto agli individui che non ricevono questi trattamenti. Sono state avviate diverse iniziative nazionali e internazionali per raccogliere rapidamente dati sui potenziali fattori di rischio associati alla gravità del Covid-19 nelle PcSM. La maggior parte di questi studi ha costantemente dimostrato che il sesso maschile, l'età avanzata, le comorbidità e una maggiore disabilità sono fattori di rischio per un decorso più grave della malattia. Anche il ruolo dei DMT nella gravità del Covid-19 è stato studiato con risultati contrastanti. Diversi studi hanno mostrato un aumento del rischio di un decorso grave per PcSM con un uso recente di metilprednisolone e un'ultima terapia con farmaci anti-CD20, mentre altri non hanno trovato un'associazione tra l'esposizione ai DMT e la gravità del Covid-19. Inoltre, alcuni ricercatori hanno segnalato un ruolo protettivo dell'interferone beta. Il Registro Italiano SM e patologie correlate offre la possibilità di raccogliere dati sulla storia completa della SM, in particolare dati sull'esposizione e le sequenze dei DMT utilizzati.

In questo progetto, utilizzando i dati raccolti dal Registro Italiano SM, abbiamo condotto per la prima volta, uno studio caso-controllo volto a indagare i fattori associati al rischio di contrarre il Covid-19. Ci siamo concentrati,

non solo sul ruolo dell'ultima terapia somministrata, ma anche sul potenziale effetto cumulativo delle precedenti sequenze DMT e sul luogo in cui è stato somministrato l'ultimo trattamento (cioè trattamento ospedaliero o domiciliare). Come obiettivo secondario, abbiamo ulteriormente valutato i fattori di rischio associati alla gravità del Covid-19.

## RISULTATI

Abbiamo impostato uno studio caso-controllo (1-2). I casi erano PcSM con una diagnosi confermata di COVID-19, i controlli erano PcSM senza una diagnosi confermata di Covid-19. Entrambi i gruppi sono stati appaiati attraverso il propensity score alla data della diagnosi di Covid-19, alla data dell'ultima visita e alla regione di residenza. Nessun controllo sano è stato incluso nel presente studio.

Il rischio di Covid-19 è stato stimato con modelli di regressione logistica multivariabile che hanno tenuto conto di covariate demografiche e cliniche. L'impatto dei DMT è stato valutato in tre modelli di regressione logistica indipendenti, nei quali il trattamento è stato inserito come segue: ultimo DMT somministrato o le sequenze DMT precedenti o il luogo in cui è stato somministrato l'ultimo trattamento.

Un totale di 779 casi confermati di COVID-19 sono stati appaiati a 1558 controlli. In tutti e 3 i modelli, le comorbidità, il sesso femminile e l'età più giovane erano significativamente associati ( $p < 0,02$ ) a un rischio più elevato di contrarre il COVID-19. I pazienti che hanno ricevuto natalizumab come ultimo DMT (OR (95% CI): 2,38(1,66-3,42),  $p < 0,0001$ ) e quelli che sono stati sottoposti a una strategia di trattamento scalare (1,57 (1,16-2,13),  $p = 0,003$ ) avevano un rischio significativamente più alto di contrarre il

COVID. Inoltre, le PcSM che hanno ricevuto l'ultimo DMT che richiedeva l'accesso in ospedale (1,65 (1,34-2,04),  $p < 0,0001$ ) hanno mostrato un rischio significativamente più elevato rispetto a quelle che assumevano DMT auto-somministrati a casa.

## CONCLUSIONI

Il nostro studio fornisce prove che tra i pazienti con SM, l'età più giovane, l'essere di sesso femminile, avere più co-

morbilità, ricevere natalizumab, sottoporsi a una strategia di trattamento crescente o ricevere cure in ospedale era associato all'infezione da Covid-19. Tra i pazienti con SM che sono stati infettati da Covid-19, un decorso grave è stato associato all'aumentare dell'età e ad avere una forma progressiva di SM, mentre non essere in trattamento o ricevere una terapia a base di interferone è risultato essere un fattore protettivo.

# Demographic, clinical and treatment factors associated with the risk and severity of Covid-19 in people with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

The newly emerged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2 or Covid-19) has rapidly spread across the globe becoming a pandemic.

There is a great demand for timely acquired data on the impact of the virus on people with Multiple Sclerosis (PwMS).

Up to 70% of PwMS are treated with disease-modifying therapies (DMTs) which impact the immune response; in turn, these therapeutic agents may expose the patient to increased risk of developing Covid-19 and experiencing worse Covid-19 outcomes than individuals not receiving these agents. Several national and international initiatives have been set up to rapidly collect data about potential risk factors associated with the severity of Covid-19 in PwMS. The majority of these studies have consistently demonstrated male sex, older age, comorbidities, and higher disability as risk factors for a more severe disease course. The role of DMTs in the Covid-19 severity has also been investigated with conflicting results. Different studies showed an increased risk of a severe course for PwMS with a recent use of methylprednisolone and a last therapy with depletive anti-CD20 drugs, while others did not find association between DMT exposure and Covid-19 severity. In addition, some researchers reported a protective role of Interferon beta.

The Italian MS Register offers the possibility to collect data about the complete MS history, in particular data about DMTs exposure and sequences.

In this project, using data collected from the Italian MS Register (IMSR), we conducted for the first time, a case-control study aimed at investigating factors associated with the risk of getting Covid-19. We focused not only on the role of the last administered therapy but also on the potential cumulative effect of previous DMT sequences

and on the location where the last treatment was administered (i.e. hospital- or home-based treatment). As a secondary objective, we further assessed the risk factors associated with the severity of Covid-19 outcomes.

## RESULTS

We set-up a case-control (1-2) study. Cases were PwMS with a confirmed diagnosis of Covid-19, controls were PwMS without a confirmed diagnosis of Covid-19. Both groups were propensity-score matched by the date of Covid-19 diagnosis, the date of last visit and the region of residence. No healthy controls have been included in the present study.

Covid-19 risk was estimated by multivariable logistic regression models including demographic and clinical covariates. The impact of DMTs was assessed in three independent logistic regression models including one of the following covariates: last administered DMT or previous DMT sequences or the place where the last treatment was administered.

A total of 779 confirmed Covid-19 cases were matched to 1558 controls. In all 3 models, comorbidities, female sex and a younger age were significantly associated ( $p < 0,02$ ) to a higher risk of contracting Covid-19. Patients receiving natalizumab as last DMT (OR (95% CI): 2.38(1.66-3.42),  $p < 0,0001$ ) and those who underwent an escalation treatment strategy (1.57 (1.16-2.13),  $p = 0,003$ ) were at significantly higher Covid-19 risk. Moreover, PwMS receiving their last DMT requiring hospital access (1.65 (1.34-2.04),  $p < 0,0001$ ) showed a significant higher risk than those taking self-administered DMTs at home.

## CONCLUSIONS

Our study provides evidence that among patients with MS, younger age, being female, having more comorbidities,

ties, receiving natalizumab, undergoing an escalating treatment strategy, or receiving treatment at a hospital was associated with being infected with Covid-19. Among patients with MS who were infected with Covid-19, a severe

course was associated with increasing age and having a progressive form of MS, while not being on treatment or receiving a beta-interferon agent was protective



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Iaffaldano P, Lucisano G, Manni A, Paolicelli D, Patti F, Capobianco M, Brescia Morra V, Sola P, Pesci I, Lus G, De Luca G, Lugaresi A, Cavalla P, Montepietra S, Maniscalco GT, Granella F, Ragonese P, Vianello M, Brambilla L, Totaro R, Toscano S, Malucchi S, Petracca M, Moiola L, Ferraro D, Lepore V, Mosconi P, Ponzio M, Tedeschi G, Comi G, Battaglia MA, Filippi M, Amato MP, Trojano M; Italian MS Register. Risk of Getting COVID-19 in People With Multiple Sclerosis: A Case-Control Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022 Jan 19;9(2):e1141. doi: 10.1212/NXI.0000000000001141.
- The risk of COVID-19 in people with multiple sclerosis: A case-control study from the Italian MS Register P Iaffaldano, G Lucisano, A Manni, D Paolicelli, F Patti, M Capobianco, V Brescia Morra, P Sola, I Pesci, G Lus, G De Luca, A Lugaresi, P Cavalla, F Valzania, GT Maniscalco, F Granella, P Ragonese, M Vianello, G Comi, MA Battaglia, V Lepore, M Filippi, MP Amato, M Trojano - *Multiple Sclerosis Journal*, 2021;680-681.

# Studio ETEROGENEITÀ. L'espressione fenotipica della sclerosi multipla può essere condizionata dalle caratteristiche del Centro SM di riferimento?



## Roberto Bergamaschi

*On behalf: Comitato Scientifico del Registro Italiano SM e Patologie Correlate, U.O. Sclerosi Multipla IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale "C. Mondino", Pavia, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Ettore Beghi, Cristina Bosetti, Claudia Santucci, Vito Lepore, Paola Mosconi,**  
*Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS*

**Michela Ponzio,** *Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è caratterizzata da una eterogeneità di fenotipi dovuta a diversi fattori di tipo demografico, ambientale e clinico. Inoltre, anche fattori socio-economici e le caratteristiche dei Centri Clinici SM potrebbero influenzare le caratteristiche cliniche dei pazienti.

Lo studio, di tipo retrospettivo, ha incluso pazienti con diagnosi confermata di SM, inseriti nel Registro Italiano SM e patologie correlate nel periodo di osservazione 2000-2021.

I pazienti sono stati classificati in base ai seguenti fenotipi registrati alla prima visita: sindrome clinicamente isolata (CIS), forma recidivante-remittente (RR), forma primaria progressiva (PP), forma progressiva recidivante (PR) e forma secondaria progressiva (SP).

Sono state analizzate le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti, le caratteristiche dei Centri SM (come la capacità organizzative e il numero di pazienti in carico), oltre alle macroaree geografiche e all'indice di deprivazione.

Sono stati calcolati gli Odds Ratio (OR) per i diversi fenotipi CIS, PP/PR e SP, rispetto al fenotipo RR, sulla base delle caratteristiche dei pazienti e dei Centri selezionati, utilizzando modelli di regressione logistica multivariata, multinomiale, a effetti misti, aggiustati per età, sesso e intervallo di tempo tra insorgenza della malattia e prima visita.

## RISULTATI

Lo studio ha incluso 35.243 pazienti provenienti da 106 Centri SM. La probabilità di osservare fenotipi di SM più severi in occasione della prima visita, rispetto al fenotipo RR, diminuisce significativamente in relazione al periodo di calendario (OR=0,74 di PP/PR per i periodi 2010-2014 e 2015-2021 vs 2000-2009, e OR=0,50 di SP per il periodo 2015-2021 vs 2000-2009).

Le femmine presentano un rischio significativamente inferiore rispetto ai maschi di avere un fenotipo PP/PR o SP. L'età avanzata alla prima visita è associata a forme CIS (OR=1,37 per età  $\geq 35$  vs  $<35$  anni), PP/PR (OR=9,21) e SP (OR=4,53). Il rischio di un intervallo di tempo più lungo tra l'esordio della malattia e la prima visita è risultata inferiore per il fenotipo CIS (OR=0,11 per  $\geq 13$  vs  $<13$  mesi), ma maggiore per il fenotipo PP/PR (OR=1,49) e SP (OR=10,19). La probabilità di presentare forme SP alla prima visita è risultata maggiore nel Sud (OR=1,86 vs Nord-Ovest), e la probabilità di presentare forme CIS è risultata più alta nel Nord-Est Italia (OR=1,64).

## CONCLUSIONI

Le differenze di fenotipo dei pazienti con SM italiani possono essere spiegate solo in parte dalle differenti caratteristiche dei Centri SM. Le caratteristiche demografiche e socioeconomiche dei pazienti con SM sembrano essere i principali determinanti dei fenotipi alla prima visita.

# HETEROGENEITY Study. Are multiple sclerosis (MS) phenotypes influenced by the type of referral MS center?

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is characterized by phenotypical heterogeneity that may result from the different contributions of demographic and environmental risk factors, and from overall disease severity. However, socio-economic factors and the characteristics of the local MS facilities can also influence the clinical features of patients seen in MS Centers.

This retrospective study included patients with a confirmed diagnosis of MS enrolled in the Italian MS and Related Disorders Register in 2000-2021.

Patients were classified according to the following phenotypes at first visit: clinically isolated syndrome (CIS), relapsing-remitting (RR), primary progressive (PP), progressive-relapsing (PR), and secondary progressive (SP) MS.

Patients' demographic and clinical characteristics were analyzed, along with Centers' structures, capabilities, patient loads, geographic macro-areas, and deprivation index. We computed the odds ratios (OR) for CIS, PP/PR, and SP phenotypes, compared to the RR phenotype, according to selected patients' and Centers' characteristics, using multivariate, multinomial, mixed-effects logistic regression models, adjusted for age, sex, and interval between disease onset and first visit.

## RESULTS

The study included 35,243 eligible patients from 106 MS Centers. The OR of presenting more advanced MS phenotypes at first visit, compared to the RR phenotype, significantly diminished in relation to calendar period (OR=0.74 of PP/PR for 2010-2014 period and 2015-2021 vs 2000-2009 periods, and OR=0.50 of SP for 2015-2021 vs 2000-2009 periods). Females had a significantly lower risk than males of PP/PR or SP phenotype. Older age at first visit was associated with CIS (OR=1.37 for  $\geq 35$  vs  $< 35$  years), PP/PR (OR=9.21), and SP (OR=4.53). The risk of longer interval between disease onset and first visit was lower for the CIS phenotype (OR=0.11 for  $\geq 13$  vs  $< 13$  months), but higher for PP/PR (OR=1.49) and SP phenotypes (OR=10.19). The probability of having SP at first visit was greater in the South (OR=1.86 vs North-West), and the probability of having CIS was higher in the North-East (OR=1.64).

## CONCLUSION

Differences in the phenotype of MS patients can be only partly explained by differences in the centers' structures, capabilities, and patient loads. The demographic and socio-economic characteristics of MS patients seem to be the main determinants of the phenotypes at first referral.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Bergamaschi R, Beghi E, Bosetti, Ponzio M, Santucci C, Lepore V, Mosconi P on behalf of the Italian Multiple Sclerosis and Related Disorders Register Centers Group, and the Scientific Committee of Italian SM and Related Disorders Register. Do patients' and referral centers' characteristics influence multiple sclerosis phenotypes? Results from the Italian Multiple Sclerosis and Related Disorders Register. Submitted to *Neurological Sciences*, under revision

# Caratterizzazione clinica ed evoluzione della sclerosi multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo



## Lorena Lorefice

Centro Regionale per la Diagnosi e Cura della Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Cagliari, ASL Cagliari, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Giuseppe Fenu**, Centro Regionale per la Diagnosi e Cura della Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

### COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Maria Cristina Monti**, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità di Biostatistica ed Epidemiologia Clinica, Università di Pavia, Italia

**Ottavia Eleonora Ferraro**, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità di Biostatistica ed Epidemiologia Clinica, Università di Pavia, Italia

**Centri partecipanti al Registro Italiano SM e patologie correlate IMed Web**

### MENTORE/MENTORS

**Eleonora Cocco**, Centro Regionale per la Diagnosi e Cura della Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Cagliari, ASL Cagliari

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla a esordio tardivo (late onset MS; LOMS), classicamente definita in base alla comparsa della prima manifestazione clinica dopo i 50 anni, si osserva in meno del 10% dei casi. Pochi studi hanno confrontato le caratteristiche cliniche e demografiche di questi pazienti con i casi di SM a esordio giovanile, riportando con maggiore frequenza un decorso progressivo, notoriamente associato a più severa disabilità. Le informazioni relative agli outcome clinici dei pazienti con LOMS, le implicazioni prognostiche di tale forma di malattia e la capacità di tali pazienti di rispondere alle comuni terapie disease-modifying risultano ad oggi ancora dibattute.

Il presente progetto, attraverso una raccolta multicentrica, mira a definire le caratteristiche cliniche precoci e tardive dei pazienti LOMS, al fine di precisare in un'estesa coorte italiana se tale tipologia di decorso si associ nel lungo termine a un più severo decorso di malattia, anche nelle forme recidivanti remittenti.

In particolare, attraverso l'applicazione di modelli "Group Based Trajectory Modeling" il presente studio descrive le traiettorie di disabilità dei pazienti con SM, valutando le

caratteristiche associate ai diversi andamenti di disabilità nel tempo e l'associazione con LOMS. I dati utilizzati per le traiettorie di disabilità provengono dal Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate.

Per ricavare le traiettorie di disabilità è stato utilizzato il punteggio della scala EDSS delle prime 20 visite dopo la diagnosi di SM. Infine, i profili di ciascun gruppo di pazienti identificati in una specifica traiettoria sono stati descritti utilizzando un modello multinomiale attraverso i relative risk ratio (RRR) e i relativi intervalli di confidenza al 95%. Il livello di significatività statistica è stato posto al 5% e le analisi sono state effettuate con Stata® 16.

## RISULTATI

Dei 20.826 pazienti presenti nel registro, 16.159 presentavano dati adeguati per la valutazione ai fini dello studio. Quattro gruppi con differenti traiettorie di disabilità sono stati identificati con l'utilizzo del "Group Based Trajectory Modeling". Il gruppo con andamento di EDSS più severo (A), risultava composto dal 12.3% dei soggetti con punteggio medio di EDSS superiore a 4 punti, che incrementava nel corso del tempo superando i 6 punti; il gruppo



con andamento di EDSS a media severità (B) comprendeva il 21.9% del campione e mostrava nel tempo un delta nel punteggio di EDSS di oltre 3 punti; il gruppo più corposo (C), con 50.9% dei pazienti, riportava un andamento di EDSS intorno a 2 e costante fino a 10 visite, con tendenza all'incremento nelle ultime valutazioni; infine il gruppo ad andamento benigno (D) era formato dal 14.9% dei pazienti con punteggio EDSS basso e costante nel tempo. Il modello multinomiale mostra che la probabilità di appartenere ai gruppi con severità più alta (A, B, C) è superiore per i LOMS fino a 7.0 volte ( $p < 0.001$ ). Oltre questo, la probabilità di appartenere a gruppi con severità più alta è associata al genere maschile e all'esordio clinico con sintomi a carico del troncoencefalo, spinali o in caso di interessamento multifunzionale all'esordio.

## CONCLUSIONI

Notoriamente la SM è una malattia ad alta eterogeneità (clinica, patogenetica, neuroradiologica) e si caratterizza per un'alta complessità gestionale. Fondamentale è l'inquadramento, fin dall'esordio, delle caratteristiche cliniche della malattia, e in particolare la valutazione dei fattori predittivi di peggiore outcome clinico nel lungo termine. Il presente progetto, attraverso la valutazione delle traiettorie di disabilità dei pazienti con SM, meglio definisce in che misura l'esordio tardivo di malattia (LOMS) condizioni l'evoluzione della stessa. Questo si rivela centrale anche al fine di una adeguata scelta di terapia che consideri l'aging, la minore resilienza del sistema nervoso al danno e la frequente concomitanza di comorbidità associate all'età, oltre che i fattori prognostici più prettamente associati alla malattia.

# Clinical characteristics and disease outcomes of late onset multiple sclerosis: a retrospective multicentre study

## INTRODUCTION AND AIMS

Late onset of MS (LOMS), classically defined by the occurrence of the first symptoms after age 50, it is relatively infrequent and it occurs in less than 10% of patients. Few studies have compared the clinical and demographic characteristics of these patients with young-adult onset MS cases (YOMS), more frequently reporting a progressive course, notoriously associated with more severe disability. However, there is still uncertain information about the clinical outcomes of LOMS, the response to disease modifying treatments (DMTs), and the implication for disease prognosis.

The present project is a multicentre retrospective study that aims to describe the early and late clinical characteristics of LOMS in a large cohort of Italian MS patients, using YOMS as a comparator, in order to evaluate whether the late onset is associated with a more severe disease evolution, also in the relapsing remitting forms.

By using the "Group Based Trajectory Modeling" models, this study describes the disability trajectories of MS patients, also evaluating the characteristics associated to groups with different disability trends over time and the association with LOMS. The data used to define the disability trajectories were obtained from the Italian Multiple Sclerosis Registry. The EDSS scale was used to obtain the disability trajectories in the first 20 visits after diagnosis. The profiles of the patients' groups identified in a specific trajectory were described using a multinomial model by the relative risk ratios (RRRs) and their 95% confidence

intervals. The level of statistical significance was set at 5% and the analyses were performed with Stata® 16.

## RESULTS

Of the 20,826 patients identified in the registry, 16,159 were eligible for the study. Four groups with different disability trajectories were identified by using the "Group Based Trajectory Modeling". The group with the most severe EDSS trend (A), was made up of 12.3% of the subjects with mean EDSS > 4 points, which increased over time exceeding EDSS 6; the group with medium severity EDSS trend (B) comprised 21.9% of the sample and showed a change in EDSS score of more than 3 points over time; the larger group (C) with 50.9% of patients reported a constant 2 points in EDSS trend up to 10 visits, with an increase in EDSS in the latest evaluations; finally, the benign group (D) was made up of 14.9% of patients with a low and constant EDSS score over time. The multinomial model shows that the probability of belonging to the groups with the highest severity (A, B, C) is up to 7.0 times higher for the LOMS ( $p < 0.001$ ). In addition, the probability of belonging to groups with greater severity is more associated with male sex and clinical onset with brain stem, spinal cord or multifunctional symptoms.

## CONCLUSIONS

Notoriously, MS is a highly heterogeneous disease for clinical, pathogenetic, and neuroradiological features;



it is characterized by a high management complexity. From the onset of the disease, it is important to define its clinical characteristics, and in particular to evaluate the predictors of worse long-term clinical outcome. This project defines how LOMS conditions the disease evolution, by analyzing the disability trajectories. This is also

important for the purpose of a tailored choice of DMTs that considers aging, the lower resilience of the nervous system to damage and the frequent concomitance of age-related comorbidities, in addition to the prognostic factors most strictly associated with the disease.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *EDSS trajectories in multiple sclerosis patients from the Italian MS Register. XXV<sup>o</sup> World Congress of Neurology, 3-7 October 2021. This study has been selected as oral presentation*
- *Le traiettorie di EDSS in pazienti con differente esordio di sclerosi multipla. Congress of medical statistics and clinical epidemiology (SISMEC). Dati, modelli, decisioni: metodi a servizio dell'organizzazione sanitaria, Bari, Italy 15-17 September 2021*

## Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real word life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano



### Francesco Patti

*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, GF Ingrassia, Sezione Neuroscienze, Centro Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

#### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Clara Grazia Chisari**

#### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Luigi Maria Grimaldi**, *Unità operativa di Neurologia, Fondazione Istituto G. Giglio di Cefalù, Palermo, Italia*

**Giuseppe Salemi, Paolo Ragonese**, *Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia*

**Simona Bonavita, Maddalena Sparaco**, *Università degli Studi della Campania, 'Luigi Vanvitelli', Caserta, Italia*

**Marco Rovaris**, *Fondazione Don Carlo Gnocchi, Milano, Italia*

**Alessia D'Arma**, *Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Alessandra Lugaresi**, *Università di Bologna, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche, Bologna, Italia*

**Maria Teresa Ferrò**, *ASST- CREMA, Ospedale Maggiore, Cremona, Italia*

**Paola Grossi**, *Azienda USL della Romagna Rimini, Italia*

**Alessia Di Sapia**, *Neurologia Ospedale Regina Montis Regalis, Mondovì, Torino, Italia*

**Eleonora Cocco**, *Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Franco Granella**, *Università degli studi di Parma, Parma, Italia*

**Erica Curti**, *Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma, Parma Italia*

**Vito Lepore**, *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano, Italia*

**Maria Trojano, Pietro Iaffaldano**, *Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari, Italia*

### PREMESSE E OBIETTIVI

Natalizumab (NTZ; Tysabri) è un anticorpo monoclonale umanizzato anti- $\alpha_4$  integrina che blocca l'adesione dei linfociti alle cellule endoteliali, prevenendo così la loro migrazione al sistema nervoso centrale (SNC) e riducendo l'infiammazione. Uno dei primi studi che ha valutato efficacia e sicurezza di NTZ per il trattamento della SM recidivante-remittente (AFFIRM) ha dimostrato che NTZ è stato in grado di ridurre il tasso di recidiva annualizzato (ARR)

del 68%, la comparsa di nuove lesioni iperintense in T2 o l'incremento di volume di quelle preesistenti nell'83%, progressione della disabilità sostenuta a 12 settimane del 42% e progressione della disabilità sostenuta a 24 settimane del 54% in 2 anni. Approvato nel 2006/2007, NTZ ha dimostrato una maggiore efficacia nel ridurre la progressione della SM rispetto ai farmaci di seconda linea, sebbene l'insorgenza di eventi avversi anche gravi, come la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML)

abbia imposto una rigorosa sorveglianza clinica. Difatti, il riscontro di un aumentato rischio d'insorgenza di PML nei pazienti trattati con NTZ, ha spinto i clinici a ricercare strategie per ridurre il rischio di PML e prevenire le ricadute cliniche e radiologiche frequentemente associate all'interruzione del trattamento con NTZ (rebound). A tal proposito, un recente studio ha dimostrato che una ripresa dell'attività subclinica in risonanza magnetica si verificerebbe dopo circa 7 settimane dall'ultima infusione di NTZ, suggerendo pertanto una finestra terapeutica di NTZ più ampia di quella approvata sulla base di studi clinici. Pertanto, un intervallo più ampio di tempo tra le infusioni potrebbe fornire vantaggi in termini di sicurezza (ovvero un ridotto rischio di PML), senza esporre i pazienti al rischio di riattivazione della malattia. Alla luce di questi risultati, molti Centri per la cura della SM distribuiti nel territorio italiano hanno iniziato a trattare i pazienti con SM utilizzando vari schemi terapeutici a intervalli prolungati. Questo studio osservazionale retrospettivo multicentrico ha valutato, in un'ampia popolazione italiana di pazienti con SM, l'efficacia di NTZ, confrontando la tipologia di somministrazione standard (standard interval dosing; SID) e quella ad intervalli prolungati (extended interval dosing; EID).

## RISULTATI

Sono stati reclutati 5.231 pazienti con SM recidivante remittente che avevano ricevuto NTZ dal 1 giugno 2012 al 15 maggio 2018 in 30 Centri italiani per la cura della SM. Di questi, 2.092 pazienti (età media di  $43,2 \pm 12,0$  anni; 60,6% erano donne) hanno soddisfatto i criteri di inclusione e sono stati pertanto arruolati. I restanti 3.139 pazienti sono stati esclusi a causa della incompleta disponibilità di dati.

Un totale di 1.254 (59,9%) pazienti avevano ricevuto trattamento con NTZ secondo SID e 838 (40,1%) secondo EID. I pazienti con EID avevano una durata della malattia più lunga e un EDSS più elevato all'inizio del trattamento con NTZ rispetto al SID.

A 12 e 24 mesi dall'inizio della terapia con NTZ, non sono state riscontrate differenze in termini di ARR e di expanded disability status scale (EDSS) tra i due gruppi. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in termini di percentuale di pazienti che hanno raggiunto lo stato di no evidence of disease activity (NEDA-2), di progression index (PI) e di miglioramento confermato della disabilità (confirmed disability improvement; CDI) tra i due gruppi.

A 24 mesi, la percentuale di pazienti positivi al John Cunningham virus (JCV) è aumentata dal 26,9% al 29,5% ( $p=0,14$ ), con un indice JCV significativamente più alto rispetto al basale ( $p<0,001$ ). Sia SID che EID hanno mostrato un aumento significativo dei valori dell'indice JCV rispetto al basale ( $1,1 \pm 1,4$  vs  $1,4 \pm 1,1$ ,  $p<0,001$  e  $2,0 \pm 0,9$  vs  $2,2 \pm 1,5$ ,  $p<0,001$ , rispettivamente).

A 24 mesi, nei pazienti in cui era disponibile il punteggio EDSS al basale ( $n=1651$ , 78,9% di 2092), il cumulative EDSS worsening (CEW), definito come aumento di  $\geq 1,0$  punti nel punteggio EDSS a 12 e 24 mesi, era rispettivamente il 14,3% e l'11,6%. Quando il peggioramento è stato definito come un aumento di  $\geq 2,0$  punti, le probabilità cumulative erano rispettivamente dell'8,1% e del 6,1%. Non sono state riscontrate differenze in termini di CEW tra SID ed EID.

Nella popolazione arruolata, 689 (41,7% di 1651) pazienti in SID avevano un punteggio EDSS basale 0,0-2,0, 432 (41,5% di 1040) e 257 (41,6% di 611) in EID. Tra questi pazienti, il rischio cumulativo di transizione a un punteggio EDSS  $\geq 3,0$  era del 7,3% a 12 mesi e dell'8,1% a 24 mesi. Tra i 643 (38,9% di 1651) pazienti con un punteggio EDSS basale di 2,5-3,0, 402 (38,7% di 1.040) in SID e 241 in EID (39,4% di 611), il rischio cumulativo di transizione a un punteggio EDSS di  $\geq 4,0$  era del 12,4% a 12 mesi e del 13,2% a 24 mesi con una tendenza verso una maggiore probabilità di passare da 2,0 a 3,0 a  $>4,0$  punteggio EDSS nell'EID (16,9% a 12 mesi e 16,9% a 24 mesi) rispetto al gruppo SID (12,4% a 12 mesi e 13,6% a 24 mesi). Dei 319 (19,3% di 1.651) pazienti con un punteggio EDSS basale di  $\geq 4,0$ , di cui 206 (19,8% di 1040) in SID e 113 (18,5% di 611) pazienti in EID, il rischio cumulativo di transizione confermata a un punteggio EDSS di  $\geq 6,0$  era del 18,4% a 12 mesi e del 23,6% a 24 mesi senza differenze significative tra i pazienti trattati con SID e quelli in EID. Inoltre, le curve di Kaplan-Meier per il tempo alla prima recidiva, al CEW di 1 punto e 2 punti non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

## CONCLUSIONI

Questo studio multicentrico ha dimostrato che l'utilizzo di un intervallo esteso tra le somministrazioni di NTZ ha dimostrato un'efficacia simile rispetto alla somministrazione secondo intervalli standard. Tale riscontro potrebbe aprire a nuove strategie terapeutiche se studi successivi confermeranno che tale modalità di somministrazione presenta un vantaggio anche in termini di tollerabilità e sicurezza.

# Clinical effectiveness of different natalizumab interval dosing schedules in a large Italian population of patients with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Natalizumab (NTZ; Tysabri) is a humanized anti- $\alpha$ 4 integrin monoclonal antibody that blocks lymphocyte adhesion to endothelial cells, thereby preventing their migration to the central nervous system (CNS) and reducing inflammation. The NTZ safety and efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis study (Safety and Efficacy of Natalizumab in the Treatment of Multiple Sclerosis- AFFIRM study) showed that NTZ, compared with placebo, was able to reduce the annualized relapse rate (ARR) by 68% relative to placebo, the accumulation of new or enlarging hyperintense lesions by 83%, 12-week sustained disability progression by 42% and 24-week sustained disability progression by 54% over 2 years. Since its approval in 2006/2007, NTZ has demonstrated higher efficacy in reducing the progression of MS compared with second-line drugs, although safety issues have imposed a strict clinical surveillance. The potential occurrence of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in NTZ-treated patients has prompted an intense search for the best strategy to reduce such a serious complication and to prevent the clinical and radiological relapses associated to NTZ discontinuation, in particular the risk of a clinical rebound. In this regard, an early study has proved that a progressive return of subclinical MRI activity may occur after approximately 7 weeks from the last NTZ infusion in patients with MS, suggesting that the therapeutic window of NTZ could be larger than that approved based on clinical trials. Thus, a reasonable delay of time between infusions could provide advantages in terms of safety (i.e., reduced risk of PML), likely without exposing patients to a risk of MS relapse. Therefore, in real-world clinical practice, the neurologists of Italian MS centers across the country have begun to treat patients with MS using various extended interval dosing schedules.

This multicenter retrospective observational study aims to provide additional information on NTZ effectiveness in the real-world clinical practice and to evaluate the therapeutic durability of different extended dosing strategies (standard interval dosing [SID] versus extended interval dosing [EID]) in a large Italian population of patients with MS.

## RESULTS

At the extraction date, 5231 patients with relapsing-remitting MS (RR-MS) who had received NTZ from 1 June 2012 to 15 May 2018 in 30 Italian MS centers were recruited. A total of 2092 patients (mean age of  $43.2 \pm 12.0$  years, 60.6% were women) met the inclusion criteria and were finally enrolled. The remaining 3139 patients were

excluded because of missing data. We found that 1254 (59.9%) patients received NTZ according to SID and 838 (40.1%) according to EID. EID patients had longer disease duration and higher EDSS before starting NTZ compared with SID. Moreover, the percentages of patients drug-naïve and of patients treated with immunosuppressant drugs before starting NTZ treatment were higher in the EID compared with the SID group.

At 12 and 24 months after start of NTZ, no differences in terms of annualized relapse rate (ARR) and of expanded disability status scale (EDSS) were found between the two groups. No statistically significant differences in terms of percentage of patients reaching NEDA-2, progression index (PI) and confirmed disability improvement (CDI) were found between the two groups.

Overall, at 24 months, the percentage of patients positive to the John Cunningham virus (JCV) slightly increased from 26.9% to 29.5% ( $p=0.14$ ), with a significant higher JCV index compared with baseline ( $p<0.001$ ). Stratifying according to the two different administrations schedules, after 24 months, both SID and EID groups showed a significant increase of JCV index values compared with baseline ( $1.1 \pm 1.4$  vs  $1.4 \pm 1.1$ ,  $p<0.001$  and  $2.0 \pm 0.9$  vs  $2.2 \pm 1.5$ ,  $p<0.001$ , respectively).

At 24 months, in the patients with baseline EDSS scores available ( $n=1651$ , 78.9% of 2092), the cumulative probabilities of 12-month and 24-month confirmed EDSS worsening (CEW) were 14.3% and 11.6%, respectively, with worsening defined as an increase in EDSS score of  $\geq 1.0$  point. When worsening was defined as an increase of  $\geq 2.0$  points, the cumulative probabilities were 8.1% and 6.1%, respectively. No differences in terms of CEW were found between SID and EID. In the overall population, 689 (41.7% of 1651) patients had a baseline EDSS score 0.0–2.0, 432 (41.5% of 1040) in SID and 257 (41.6% of 611) in EID. Among these patients, the cumulative risk of confirmed transition to an EDSS score  $\geq 3.0$  was 7.3% at 12 months and 8.1% at 24 months. Among the 643 (38.9% of 1651) patients with a baseline EDSS score of 2.5–3.0, 402 (38.7% of 1,040) in SID and 241 in EID (39.4% of 611), the cumulative risk of confirmed transition to an EDSS score of  $\geq 4.0$  was 12.4% at 12 months and 13.2% at 24 months with a trend towards a higher probability to proceed from 2.0 to 3.0 to  $>4.0$  EDSS score in the EID (16.9% at 12 months and 16.9% at 24 months) versus the SID (12.4% at 12 months and 13.6% at 24 months) group. For the 319 (19.3% of 1,651) patients with a baseline EDSS score of  $\geq 4.0$ , 206 (19.8% of 1040) in SID and 113 (18.5% of 611) patients in EID, the cumulative risk of confirmed transi-

tion to an EDSS score of  $\geq 6.0$  was 18.4% at 12 months and 23.6% at 24 months with no differences between SID and EID patients. Moreover, Kaplan-Meier estimates for the first relapse occurrence, CEW of 1 point and CEW of 2 points showed no statistically significant differences between the two groups.

## CONCLUSIONS

The use of NTZ with an extended interval schedule showed similar effectiveness compared with SID. Unchanged clinical efficacy of EID schedule may raise the question of a possible advantage in terms of tolerability and safety.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Chisari CG, Grimaldi LM, Salemi G, Ragonese P, Iaffaldano P, Bonavita S, Sparaco M, Rovaris M, D'Arma A, Lugaresi A, Ferrò MT, Grossi P, Di Sapia A, Cocco E, Granella F, Curti E, Lepore V, Trojano M, Patti F; Italian MS Register Study Group. Clinical effectiveness of different natalizumab interval dosing schedules in a large Italian population of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Dec;91(12):1297-1303. doi: 10.1136/jnnp-2020-323472

# Il fenotipo e il recupero delle ricadute nei pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente: vecchie e nuove terapie modificanti il decorso a confronto



## Emanuele D'Amico

*Dipartimento Di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Aurora Zanghì, Francesco Patti**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Carlo Avolio**, *Dipartimento Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italia*

**Simonetta Galgani**, *Centro SM, Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma, Italia*

**Paolo Bellantonio**, *Centro SM Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) Neuromed, Pozzilli, Italia*

**Mauro Zaffaroni**, *Centro SM di Gallarate, ASST della Valle Olona, Gallarate (VA), Italia*

**Giovanna Borriello**, *Centro per la diagnosi e cura della Sclerosi Multipla, U.O di Neurologia, Ospedale Sant'Andrea, Roma, Italia*

**Matilde Inglese**, *Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI), Ospedale Policlinico San Martino-IRCCS, Genova, Italia*

**Silvia Romano**, *Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Ospedale S.Andrea, Roma, Italia*

**Antonella Conte**, *Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma; IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) Neuromed, Pozzilli, Italia*

**Maria Trojano**, *Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il decorso clinico della sclerosi multipla recidivante-remittente (SMRR) è in gran parte determinato dalla frequenza, gravità e recupero delle ricadute, che mostrano un'estrema variabilità durante il decorso della malattia. Un'elevata frequenza e gravità delle ricadute, in particolare nei primi 2 anni, sono state descritte come forti predittori di accumulo di disabilità e fallimento(i) del trattamento/i. Il fenotipo delle ricadute non è stato completamente studiato e non è stato incluso come parametro negli studi clinici per verificare l'efficacia di una terapia modificante il decorso e, ad oggi, sono disponibili scarsi dati con risultati controversi da piccoli studi. La guarigione incompleta, definita dalla persistenza di deficit neurologici dopo una ricaduta, è stata osservata nel 34-59% delle ricadute. In particolare, è stato dimostrato che il grado di recupero dalle prime

ricadute nel decorso di malattia di un paziente predice il livello di progressione della disabilità e il tempo di transizione alla forma secondaria progressiva, sebbene l'associazione di ciascun fenotipo al grado di recupero non sia stata caratterizzato in modo inequivocabile.

L'obiettivo primario dello studio era la valutazione del fenotipo della prima ricaduta nei pazienti con SMRR in generale e sulla base del DMT di prima linea prescritta durante i primi 5 anni di trattamento. Successivamente, è stato determinato il recupero incompleto (sequele) basato sul fenotipo di ricaduta e sul tipo di DMT di prima linea. In aggiunta, è stato studiato il ruolo di ciascun fenotipo di ricaduta sulla probabilità di ottenere un punteggio EDSS  $\geq 4,0$  durante l'intero periodo di follow-up (i primi 5 anni di terapia a meno che il DMT non fosse stato interrotto prima).

## RISULTATI

Tutti i 2.676 pazienti hanno soddisfatto i criteri richiesti. È stato determinato il fenotipo della prima ricaduta di 712 ricadute. Il sesso femminile e un numero maggiore di recidive prima della diagnosi erano associati a un rischio maggiore di recidiva nel periodo di 5 anni (HR = 1,3, IC 95% 1,07–1,46;  $p = 0,005$  e HR = 1,1, IC 95% 1,06–1,15;  $p < 0,001$ , rispettivamente) mentre l'età più avanzata al momento della prima terapia prescritta (HR = 0,98, IC 95% 0,98–0,99;  $p < 0,001$ ) a un rischio inferiore. Il fenotipo piramidale era associato a un'età più alta e al punteggio EDSS basale. L'età avanzata era correlata anche con sequele peggiori (OR proporzionale = 1,02, IC 95%

1,01–1,04;  $p = 0,004$ ), come il verificarsi di una seconda ricaduta prima dell'inizio del DMT (OR proporzionale = 1,72, IC 95% 1,01–2,92;  $p = 0,044$ ). Il fenotipo piramidale, aggiustato per età e altri fenotipi era associato a un rischio 1,95 volte maggiore di sequele gravi o moderate (OR proporzionale = 1,95 IC 95% 1,35–2,80;  $p < 0,001$ ).

## CONCLUSIONI

La caratterizzazione di diversi fenotipi di recidiva dalle prime fasi della SMRR e dalla prima terapia prescritta prescritta dovrebbe essere considerata un determinante della scelta terapeutica.

# First relapse phenotype and recovery in naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients undergoing old and new disease modifying therapies: an Italian Registry study

## INTRODUCTION AND AIMS

The clinical course of relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) is largely determined by the frequency, severity, and recovery of relapses, which show extreme variability during the disease course.

A high frequency and severity of relapses, particularly in the first 2 years, have been described as strong predictors of greater disease burden in terms of disability accumulation and treatment failure(s).

The relapse phenotype has not been fully investigated and it has not been included as a parameter in clinical trials to verify a disease modifying therapy (DMT) and scarce data with controversial results are available from small studies. The incomplete recovery, defined by the persistence of neurologic deficits after a relapse, has been observed in 34–59% of relapses.

The disease characteristics that could be associated to the degree of recovery have only been found in few real-world studies and cannot be generalized.

Notably, the degree of recovery from the first relapse in a patient's course was shown to predict the time to disability progression and the time to transition into secondary progressive MS, although the association of each relapse phenotype to the degree of recovery has not been characterized unequivocally.

The primary study outcome was the evaluation of first relapse phenotype in RRMS patients generally and based on the first-line DMT prescribed during the first 5 years of treatment. Next, incomplete recovery (sequelae) based on relapse phenotype and the type of first-line DMT was

determined.

Ancillary, the role of each relapse phenotype on the probability to obtain an EDSS score  $\geq 4.0$  during the entire follow-up period (the first 5 years of therapy unless the DMT was discontinued earlier) was investigated.

## RESULTS

All the 2,676 patients fulfilled the required criteria. The first-relapse phenotype of 712 relapses was determined. Being female and higher number of relapses before diagnosis were associated with higher risk of relapse in the 5-year period (HR = 1.3, 95%CI 1.07–1.46;  $p = 0.005$  and HR = 1.1, 95%CI 1.06–1.15;  $p < 0.001$ , respectively) whilst older age at the time of first DMT prescribed (HR = 0.98, 95% CI 0.98–0.99;  $p < 0.001$ ) to a lower risk. The pyramidal phenotype was associated with higher age and baseline EDSS score. Older age correlated also with worse sequelae (proportional OR = 1.02, 95%CI 1.01–1.04;  $p = 0.004$ ), as the occurrence of a second relapse before the DMT starting (proportional OR = 1.72, 95%CI 1.01–2.92;  $p = 0.044$ ). The pyramidal phenotype, adjusted for age and other phenotypes was associated to a 1.95-fold higher risk of severe or moderate sequelae (proportional OR = 1.95 95%CI 1.35–2.80;  $p < 0.001$ ).

## CONCLUSIONS

The characterization of different relapse phenotypes from early phases of RRMS and the first DMT prescribed should be considered a determinant of therapeutic choice.





## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *First relapse phenotype and recovery in naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients undergoing first-line therapies: an Italian Registry study. Submitted to EAN 2022 as poster*
- *First relapse phenotype and recovery in naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients undergoing first-line therapies: an Italian Registry study. Presented as poster to ECTRIMS 2021 and accepted as a poster for the next AAN congress 2022*

# Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico



## Emanuele D'Amico

*Dipartimento Di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Aurora Zanghi, Francesco Patti**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Marzia Romeo**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

**Eleonora Cocco**, Dipartimento di Scienze Mediche e Salute Pubblica, Università di Cagliari, Centro SM, Cagliari, Italia

**Giorgia Teresa Maniscalco**, Neurologia, Ospedale Cardarelli, Centro Regionale per la Sclerosi Multipla, Napoli, Italia

**Vincenzo Brescia Morra**, Centro di Cura e Ricerca Clinica per la SM, Dipartimento di Neuroscienze (NSRO), Università Federico II, Napoli, Italia

**Giovanna De Luca, Marco Onofri**, Clinica Neurologica, Università G. D'Annunzio, Policlinico SS Annunziata Chieti, Italia

**Simonetta Galgani, Centro SM**, Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma, Italia

**Maria Pia Amato**, Dipartimento NEUROFARBA, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

**Giuseppe Salemi**, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

**Matilde Inglese**, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI), Ospedale Policlinico San Martino-IRCCS, Genova, Italia

**Paolo Agostino Confalonieri**, Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano, Italia

**Giacomo Lus**, Centro SM, II Divisione di Neurologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italia

**Carlo Avolio**, Dipartimento Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italia

**Antonio Gallo**, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Marika Vianello**, O.U. Neurologia, Ospedale "Ca' Foncello", Unità SM, Treviso, Italia

**Massimo Filippi**, Dipartimento di Neurologia, Neurofisiologia e Neuroriabilitazione, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

**Maria Trojano, Damiano Paoloicelli**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le terapie per la sclerosi multipla (SM) sono cambiate considerevolmente negli ultimi decenni, con l'approvazione delle terapie orali e a seguito della dimostrazione della loro efficacia e sicurezza per il trattamento delle forme recidivanti remittenti della SM (SMRR).

Questo studio di coorte multicentrico, osservazionale, acquisito retrospettivamente e corretto con il propensity score, ha utilizzato pazienti con SMRR, naïve alle terapie che hanno iniziato terapie di prima linea iniettabili od orali tra il 1 gennaio 2010 e il 31 dicembre 2017, per valutare l'impatto sul decorso di malattia nei pazienti.

## RISULTATI

I pazienti arruolati sono stati divisi in due gruppi, vale a dire il gruppo dei pazienti con i farmaci iniettabili (IG) e il gruppo dei pazienti con farmaci orali (OG). Su una coorte di 11.416 pazienti, 4.602 sono stati arruolati (3.919 nel gruppo IG e 683 nel gruppo OG). Il gruppo IG aveva un tasso più alto di pazienti di sesso femminile (67,3% vs 63,4%,  $p < 0,05$ ) e un'età media inferiore ( $36,1 \pm 10,9$  vs  $38,9 \pm 11,8$ ,  $p < 0,001$ ). Il rischio di avere una prima ricaduta era più basso nel gruppo OG (HR=0,58; CI 95% 0,48-0,72,  $p < 0,001$ ). In merito alla disabilità confermata tra i due gruppi non si è riscontrata differenza (HR =0,94; CI 95% 0,76-1,29,  $p = 0.002$ ).

Il gruppo OG ha avuto altresì un rischio inferiore di interruzione del trattamento (HR= 0.72; CI 95% 0,58-0,88,  $p = 0,002$ ).

## CONCLUSIONE

I dati del Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate suggeriscono che i farmaci orali di prima linea sono associati a un rischio inferiore di sperimentare una nuova ricaduta e di interrompere la terapia rispetto ai farmaci iniettabili. Da questo progetto di ricerca sono derivate tre pubblicazioni, incentrate sul confronto tra i farmaci di prima linea nella terapia della SM.

# Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) therapies have changed considerably over the last several decades, with the approval of oral disease modifying therapies (DMTs) following the demonstration of efficacy and safety for the treatment of the relapsing forms of MS (RRMS).

This multicenter, observational, retrospectively acquired, and propensity adjusted cohort study utilized RRMS-naïve patients from the Italian MS Register who started either injectable or oral first-line DMTs between January 1, 2010, and December 31, 2017, to evaluate the impact on disability outcomes in patients.

## RESULTS

Enrolled patients were divided into two groups, namely the injectable group (IG) and the oral group (OG). Of a cohort of 11,416 patients, 4,602 were enrolled (3919 in the IG and 683 in the OG). The IG had a higher rate

of women (67.3% vs 63.4%,  $p < 0.05$ ) and a lower mean age ( $36.1 \pm 10.9$  vs  $38.9 \pm 11.8$ ,  $p < 0.001$ ). The event time to first relapse demonstrated a lower risk in the OG (HR = 0.58; CI 95% 0.48–0.72,  $p < 0.001$ ). However, no differences were found between the two groups with respect to the risk of CDP (HR = 0.94; CI 95% 0.76–1.29,  $p = 0.941$ ), while a lower risk of DMT was found in the OG (HR = 0.72; CI 95% 0.58–0.88,  $p = 0.002$ ) for the event time to discontinuation.

## CONCLUSIONS

Real-world data from the Italian MS Register suggests that first-line oral DMTs are associated with a lower risk of experiencing a new relapse and of therapy discontinuation compared to injectable DMTs. From this project derived three scientific publications, focusing on first line DMT's comparison.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- D'Amico E, Zanghì A, Romeo M, et al. *Injectable Versus Oral First-Line Disease-Modifying Therapies: Results from the Italian MS Register. Neurotherapeutics.* 2021;18(2):905-919. doi:10.1007/s13311-020-01001-6
- Zanghì A, Avolio C, Amato MP, et al. *First-line therapies in late-onset multiple sclerosis: An Italian registry study. Eur J Neurol.* 2021;28(12):4117-4123. doi:10.1111/ene.15006
- Zanghì A, Avolio C, Amato MP, et al. *Real world comparison of teriflunomide and dimethyl fumarate in naïve relapsing multiple sclerosis patients: Evidence from the Italian MS register. Mult Scler Relat Disord.* 2022;58:103489. doi:10.1016/j.msard.2022.103489

# PROGETTI APPROVATI REGISTRO ITALIANO SM E PATOLOGIE CORRELATE 2016-2022

## APPROVED PROJECTS ITALIAN MS REGISTRY AND RELATED DISORDERS 2016-2022

### EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA / DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY

#### Maria Pia Amato

##### **Progressione silente in una coorte Italiana di pazienti con CIS e SM recidivante -remittente**

Silent progression in an Italian CIS and Relapsing-Remitting MS cohort

#### Mario Alberto Battaglia on behalf of Scientific Committee

##### **Validazione di un metodo per l'identificazione di casi prevalenti e incidenti di SM utilizzando differenti sorgenti di dati. Un case study in alcune provincie della regione Emilia Romagna**

Validate a case definition of MS using different electronic (health and social) record: case study on selected provinces of Emilia Romagna Region

#### Roberto Bergamaschi

##### **Studio ETEROGENEITA'. L'espressione fenotipica della sclerosi multipla (SM) può essere condizionata dalle caratteristiche del centro SM di riferimento?**

HETEROGENEITY Study. Are multiple sclerosis (MS) phenotypes influenced by the type of referral MS center?

#### Roberto Bergamaschi

##### **L'inquinamento atmosferico come possibile fattore di rischio della SM. Uno studio ecologico sulla popolazione Italiana**

Air pollution as a risk factor of MS. An ecological study in the Italian population (The AIRMUS study)

#### Marco Capobianco

##### **Attività di malattia della Sclerosi Multipla e pandemia di SARS-COV2: uno studio di popolazione dal Registro Italiano SM**

Multiple Sclerosis disease activity and SARS-COV2 pandemic: a population based study from the Italian MS Registry

#### Giuseppe Fenu

##### **Variazione delle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da SM con diagnosi tra il 1983 e il 2016**

Changes of clinical and demographic characteristics in patients with MS diagnosis during the various decades between 1983 and 2016

#### Jessica Frau

##### **Valutazione dei fattori prognostici al basale in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da SM**

Evaluation of baseline prognostic factors in a large Italian cohort of patients with MS

#### Maurizio Angelo Leone

##### **Integrazione di dati genetici e fenotipici tra il data-base PROGEMUS e il Registro Italiano SM**

Integrating genetic and phenotypic data from the PROGEMUS data-base and the Italian MS registry

#### Lorena Lorefice

##### **Caratterizzazione clinica ed evoluzione della SM ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo**

Clinical characteristics and disease outcomes of late onset MS: a retrospective multicenter study

#### Paola Mosconi

##### **on behalf of Scientific Committee**

##### **Valutazione della progressione della disabilità, non correlata a riacutizzazione, utilizzando "EDSS roving" verso "EDSS basale": una validazione real world attraverso i dati del Registro Italiano SM.**

The use of a roving EDSS reference value to enhance detection of EDSS worsening events: A real world evaluation through the Italian MS Register

## Carla Tortorella

**Fattori prognostici clinico-radiologici nelle patologie dello spettro della Neuromielite Ottica e associate ad anticorpi anti-MOG. Analisi di coorte dal Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate ed implementazione di uno specifico dataset.**

Clinical and radiological prognostic predictors in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders (NMOSD) and MOG Antibody-mediated disorders (MOGAD). Evaluation by Italian MS Registry and implementation of disease-specific dataset

## Maria Trojano

**Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano SM sulle forme secondariamente progressive**

INTEREST: Italian MS Registry non interventional retrospective analysis in secondary progressive MS

## Maria Trojano

**Fattori demografici, clinici e terapeutici associati al rischio ed alla severità di Covid-19 in persone con SM**

Demographic, clinical and treatment factors associated with the risk and severity of Covid-19 in people with MS

## Monica Ulivelli

**Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasmissibili -prevenibili da vaccino-, e sicurezza dei vaccini, in una coorte di pazienti con SM. Studio multicentrico Italiano**

Immunisation status against major communicable diseases preventable with vaccines, and safety of vaccines, in a cohort of MS patients. An Italian multicenter study

## OTTIMIZZAZIONE DELLE TERAPIE / THERAPY OPTIMIZATION

### Analisi delle terapie / Therapy analysis

## Maria Pia Amato

**Valutare l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti nella SM progressiva**

Assessing efficacy and safety of treatments in progressive MS

## Emanuele D'Amico

**Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con SM: risultati da uno studio multicentrico**

Comparative effectiveness of initial treatment choices for MS: a multicentre study

## Emanuele D'Amico

**Il fenotipo e il recupero delle ricadute nei pazienti con SM recidivante remittente: vecchie e nuove terapie modificanti il decorso a confronto.**

Exploring phenotype and recovery from relapses in relapsing-remitting MS patients: old versus new disease-modifying therapies

## Diana Ferraro

**Rischi associati alla durata del wash-out nel passaggio da fingolimod a farmaci depletivi**

Risks associated with wash-out duration when switching from fingolimod to cell-depleting agents

## Antonio Gallo

**Studio OCREVID (Utilizzo dell'OCRELizumab durante la pandemia di coVID-19 in Italia)**

OCREVID Study (The management of OCRElizumab during the coVID-19 pandemic in Italy)

## Matilde Inglese

**Trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento della SM secondariamente progressiva: studio comparativo con pazienti del Registro Italiano SM**

Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for secondary progressive MS: a comparative study with matched control patients from the Italian MS Register

## Damiano Paolicelli

**Studio di coorte acquisita retrospettivamente sulla valutazione dell'impatto nel lungo termine di differenti strategie terapeutiche su outcomes di disabilità nella SM remittente. Registro Italiano iMedWeb. Studio RE.LO.DI.MS**

Retrospective study to evaluate the long-term impact of different treatment strategies on disability outcomes in patients with relapsing MS. Italian iMedWeb MS Registry. RE.LO.DI.MS Study

## Damiano Paolicelli

**Caratterizzare il rischio di eventi avversi gravi durante il sequencing dei trattamenti nei pazienti con SM: analisi di coorte basata sul Registro Italiano SM**

PROfiling the risk of Severe Adverse Events during sequencing therapies in patients with MS: an observational cohort analysis based on Italian MS Registry

## Francesco Patti

**Studio pilota retrospettivo sugli effetti a lungo termine di Cladribina in pazienti affetti da SM recidivante remittente o sindrome clinicamente isolata.**

Retrospective pilot study on long-term Cladribine effects in patients with relapsing remitting MS or clinically isolated syndrome

## Francesco Patti

**Studio retrospettivo multicentrico sulla valutazione dell'efficacia di ocrelizumab nei pazienti affetti da sclerosi multipla primariamente progressiva (OPPORTUNITY)**

Evaluating the efficacy of Ocrelizumab in Primary Progressive Multiple Sclerosis: a multicenter retrospective study (OPPORTUNITY)

## Maria Trojano

**Definire le scelte di trattamento nella SM durante due differenti epoche: un'analisi della real life utilizzando il Registro Italiano SM**

Profiling treatment choices in MS during two different eras: a real world assessment in the Italian MS Registry

## Maria Trojano

**Big MS Data (BMSD) network**

Big MS Data (BMSD) network

## Maria Trojano

**Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano SM per valutare l'impatto dell'attività di malattia nelle scelte terapeutiche durante le fasi recidivante e progressiva attiva di SM**

EPID-MS Evaluation of the drivers of the therapy switch in active RRMS and active SPMS patients

## Progetti specifici / Specific projects

## Matilde Inglese

**Il concetto di persistenza nel miglioramento di disabilità: un'applicazione del modello di Markov ai pazienti trattati del Registro Italiano.**

The concept of persistence in disability improvement: an application of Markov model to treated patients from the Italian Registry

## Francesco Patti

**Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real world life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano.**

Comparative effectiveness of different Natalizumab dosing schedules in real world life: a retrospective Italian multicentre study.

## Marco Salvetti

**Utilizzo di tecniche di Machine Learning per prevedere il decorso della SM recidivante-remittente nei singoli pazienti.**

Use of Machine Learning techniques in predicting the course of relapsing-remitting MS in individual patients

**Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta alla terapia / Prognostic factors and predictive models of response to therapy**

## Roberto Bergamaschi

**Predire precocemente l'evoluzione sfavorevole dei pazienti con Sindrome Clinicamente Isolata (CIS). Lo studio RECIS (Risk Estimate for CIS)**

Early prediction of unfavorable evolution of Clinically Isolated Syndrome (CIS) patients. RECIS (Risk Estimate for CIS) study

## Emanuele D'Amico

**Interrompere o continuare le terapie modificanti il decorso di malattia nella forma secondariamente progressiva di Sclerosi Multipla: uno studio di confronto sulle traiettorie di disabilità**

Stop or not the disease-modifying therapies in secondary progressive multiple sclerosis: a comparison study of disability accrual trajectory

## Massimo Filippi

**Fattori predittivi di risposta alla terapia con cladribina in pazienti affetti da sclerosi multipla**

Predictors of response to cladribine in multiple sclerosis patients

## Marzia Romeo

**Fattori predittivi di progressione di disabilità in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da SM**

Predictive factors of disability progression in a large cohort of Italian MS patients

## Maria Trojano

**Analisi del Registro Italiano di SM per studiare il concetto di progressione indipendente dalle ricadute**

INSPIRA - Italian analysis of the National MS registry Studying the concept of Progression Independent from Relapse Activity

## Maria Trojano

**Confronto tra due diversi algoritmi di trattamento nella SM recidivante: approccio aggressivo sin dall'esordio in confronto al classico schema sequenziale**

Early-aggressive treatment algorithm versus classical escalation therapy in relapsing MS



## FORME RARE DI SM / RARE FORMS OF MS

### Maria Pia Amato

#### **E-MUSIC: Early MS Italian Cohort**

E-MUSIC: Early MS Italian Cohort

### Maria Pia Amato

#### **Definizione dei predittori precoci clinici e di risonanza magnetica di risposta al trattamento nei pazienti con SM pediatrica**

Assessing early clinical and MRI predictors of treatment response in pediatric MS patients

### Damiano Baroncini

#### **Valutare il decorso clinico della SM a esordio pediatrico in ere differenti di trattamento: stiamo davvero modificando la malattia?**

Assessing the clinical course of pediatric onset MS in different treatment eras: are we really modifying the disease?

### Emanuele D'Amico

#### **Il ruolo della gravidanza nei disturbi dello spettro della neuromielite ottica**

The influence of pregnancy on neuromyelitis optical spectrum disorder

### Francesco Patti

#### **Studio retrospettivo sulle caratteristiche cliniche e radiologiche dei pazienti ad esordio tardivo di sclerosi multipla**

Clinical and neuroradiological findings in patients with late-onset multiple sclerosis (LOMS)

### Giovanni Ristori

#### **Prevenzione secondaria nella Sclerosi Multipla: il vaccino "Bacille Calmette-Guérin" (BCG) nei pazienti con Sindrome Radiologicamente Isolata (RIS)**

Secondary prevention in multiple sclerosis: "Bacille Calmette-Guérin" (BCG) vaccine in people with radiologically isolated syndrome (RIS)

# COMITATO SCIENTIFICO REGISTRO ITALIANO SM E PATOLOGIE CORRELATE 2021

## ITALIAN MS REGISTRY SCIENTIFIC COMMITTEE AND RELATED DISORDERS 2021

---

### **Maria Trojano**

*Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base,  
Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari*  
Presidente / President

### **Mario Alberto Battaglia**

*Presidente della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova*  
Vice-presidente / Vice-president

### **Marco Capobianco**

*Centro Regionale di riferimento per la Sclerosi Multipla, Unità Neurologica,  
Ospedale Universitario San Luigi Orbassano, Torino*  
Rappresentante dei Centri clinici SM / on behalf of MS Italian centers

### **Maura Pugliatti**

*Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara*  
Rappresentante dei Centri clinici SM / on behalf of MS Italian centers

### **Monica Ulivelli**

*Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche e Neuroscienze, Università di Siena, Siena*  
Rappresentante dei Centri clinici SM / on behalf of MS Italian centers

### **Claudio Gasperini**

*Dipartimento di Neuroscienze, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma*  
Rappresentante gruppo di studio sulla SM della SIN / Representative of the SIN study group on SM

### **Paola Mosconi**

*Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano*  
Rappresentante Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri / on behalf of IRCCS Mario Negri

### **Roberto Bergamaschi**

*IRCCS Fondazione Mondino, Pavia*  
Segretario ed Esperto / Secretary and Specialist

### **Maria Pia Amato**

*Dipartimento di NEUROFARBA, Università di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze*  
Esperto / Specialist

### **Giancarlo Comi**

*Università Vita-Salute, San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano*  
Esperto / Specialist

### **Francesco Patti**

*Centro SM, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Policlinico Vittorio Emanuela,  
Università degli Studi di Catania, Catania*  
Esperto / Specialist

---

# **Network Italiano di neuroimaging (INNI)**

The Italian Neuroimaging  
Network Initiative (INNI)

---

# Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM

La risonanza magnetica è un importante strumento para-clinico per diagnosticare e monitorare la sclerosi multipla (SM). La definizione di metodi standardizzati per la raccolta e l'analisi di tecniche MRI avanzate è fondamentale non solo per migliorare la comprensione della fisiopatologia e dell'evoluzione della malattia, ma anche per generare ipotesi di ricerca, monitorare il trattamento, aumentare il rapporto costo-efficacia e la potenza delle sperimentazioni cliniche.

**L'iniziativa INNI**, che coinvolge centri e ricercatori con competenze riconosciute a livello internazionale, ha l'obiettivo principale di determinare e convalidare nuovi biomarcatori di risonanza magnetica (RM) da utilizzare come predittori e / o risultati in futuri studi sulla SM. Inoltre, INNI mira anche a guidare l'applicazione della risonanza magnetica per la SM a livello nazionale. La definizione di standard di RM e protocolli clinici per la valutazione dei pazienti con SM in Italia, consentirà di integrare i dati ottenuti da diversi centri, per testare specifiche ipotesi di ricerca sulla fisiopatologia della malattia e sugli effetti del trattamento che potrebbero infine promuovere la medicina personalizzata.

Il network INNI è guidato da un Comitato Scientifico i cui membri sono il Principal Investigator dello studio (Massimo Filippi di Milano), i leader degli altri centri coinvolti nell'iniziativa (Patrizia Pantano di Roma, Nicola De Stefano di Siena, Gioacchino Tedeschi di Napoli e Maria Rocca di Milano) e rappresentanti della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), proprietaria del database. Il database INNI online è disponibile all'indirizzo: <https://database.inni-ms.org>.

Il contenuto del database è disponibile solo per gli utenti autorizzati, che hanno ricevuto login e password appropriati.

Attualmente, sono presenti nel database i dati di 2.173 soggetti di cui 1.362 persone con SM e 811 controlli sani, con l'aumento di 446 scansioni RM durante l'ultimo anno. Per accedere ai dati, deve essere presentata al Comitato Scientifico per l'approvazione una proposta di ricerca, che spiega nel dettaglio i principali obiettivi del progetto e il progresso nella conoscenza che ne seguirà. Al momento della registrazione, gli utenti avranno pieno accesso ai set

di dati richiesti, e il diritto di utilizzo dei medesimi per scopi non commerciali.

Durante la prima fase del progetto è stato realizzato un sistema web-based (<https://database.inni-ms.org>) in collaborazione con il consorzio GARR, il network Italiano per la ricerca e la formazione ([www.garr.it](http://www.garr.it)). Consente la raccolta online di dati clinici, neuropsicologici e di risonanza magnetica dai centri partecipanti.

Durante il primo triennio, INNI agirà su tre diverse linee strategiche di azione:

1. Manutenzione e espansione continua dell'infrastruttura
2. sviluppo di progetti di ricerca ad hoc basati sul contenuto di dati di INNI, finalizzati a convalidare a livello multicentrico le tecniche di risonanza magnetica
3. Promozione di un piano per la standardizzazione dell'uso della risonanza magnetica a livello nazionale, proponendo protocolli di acquisizione standardizzati da applicare per lo studio della malattia e aiutando i centri in tutta Italia alla messa a punto di questo protocollo, al fine di rendere omogeneo l'approccio per le persone con SM a livello nazionale.

Per quanto riguarda la linea strategica 1, sono stati caricati molti dati con l'inclusione aggiuntiva di 642 soggetti negli ultimi 3 anni. Attualmente 2.352 soggetti, rispetto ai 1.710 soggetti precedenti e di ulteriori 1.578 esami di risonanza magnetica per un totale di 4.381 esami, di risonanza magnetica rispetto ai 2.803 esami dall'inizio del progetto.

Per soddisfare la linea strategica 2, quattro centri partecipanti hanno completato l'analisi dei loro progetti di ricerca. Le azioni specifiche eseguite per ciascun progetto di ricerca sono riportate in dettaglio nella sezione successiva.

Per l'Azione 3, i progetti di ricerca hanno contribuito a identificare gli approcci più appropriati per la gestione dei dati multicentrici nella SM, in particolare per quanto riguarda la stima dell'atrofia. La diffusione di tali risultati è in corso attraverso pubblicazioni scientifiche, ma altre azioni sono in fase di sviluppo nel corso del prossimo anno per raggiungere i centri italiani.

# The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to optimize the use of advanced MRI techniques in patients with MS

Magnetic resonance imaging (MRI) is an important paraclinical tool to diagnose and monitor multiple sclerosis (MS). The definition of standardized methods for the collection and analysis of advanced MRI techniques is central not only to improve the understanding of disease pathophysiology and evolution, but also to generate research hypotheses, monitor treatment, increase cost-effectiveness and power of clinical trials.

**The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI)**, which involves centres and investigators with an International recognized expertise, has the major goal to determine and validate novel magnetic resonance imaging (MRI) biomarkers to be utilized as predictors and/or outcomes in future MS studies. In addition, INNI aims also to guide the application of MRI in MS at a national level. The definition of MRI standards and clinical protocols for the evaluation of MS patients in Italy will allow to integrate the data obtained from different centers to test specific hypotheses of research on the pathophysiology of the disease and on the effects of the treatment which might ultimately promote personalized medicine.

The INNI network is led by a Scientific Committee whose members are the principal investigator of the initiative (Massimo Filippi from Milan), the leaders of the other four MS centres involved in the initiative (Patrizia Pantano from Rome, Nicola De Stefano from Siena, Gioacchino Tedeschi from Naples and Maria Rocca of Milan) and representatives of the Italian Multiple Sclerosis Foundation (FISM), owner of the database, but will be open to additional members.

The online INNI database is available at: <https://database.inni-ms.org>. The database content is available for authorized users only, who received appropriate login and password.

During the first phase of the project, a web-based system was created (<https://database.inni-ms.org>) in collaboration with the GARR consortium, the Italian network for research and education ([www.garr.it](http://www.garr.it)). It allows the onli-

ne collection of clinical, neuropsychological and MRI data from the participating centres. According to the first INNI survey, performed in 2017, more than 1300 subjects were uploaded in the online platform.

During the next three-year period, INNI will be acting on three different aspects:

1. Maintenance and continuous expansion of the infrastructure, including upload of new data, verification and pre-processing of data uploaded in the database, and implementation of new platform features (Action 1);
2. Development of ad-hoc research projects based on INNI content, aimed at a multicenter validation of MRI techniques (Action 2);
3. Promotion of a plan for the standardization of the use of MRI at a national level, by proposing standardized acquisition protocols to be applied for the study of MS patients and helping peripheral centers in the set-up of this protocol, in order to homogenize the approach to MS patients at a national level (Action 3).

With regards to Action 1, the upload of data of subjects led to the additional inclusion of 642 subjects during the last 3 years (currently, 2,352 subjects, compared to 1,710 subjects at grant start) and of additional 1,578 MRI exams (currently, 4,381 MRI exams, compared to 2,803 exams at grant start).

With regards to Action 2, the four participating centres completed the analysis of their research projects. Specific actions performed for each research project are reported in details in the next section.

With regards to Action 3, research projects helped to identify the most appropriate approaches for handling multicentre data in MS, especially with regards to atrophy estimation. The dissemination of such results is in progress through scientific publications, but other actions are under development during the course of next year to reach Italian centers.



LISTA DEI CENTRI PARTECIPANTI COINVOLTI NEL PROGETTO/ LIST OF THE  
PARTECIPANTS CENTER INVOLVED IN THE PROJECT

**Massimo Filippi**, *Neuroimaging Research Unit, Istituto Scientifico San Raffaele,  
Università "Vita-Salute" San Raffaele, Milano*

**Patrizia Pantano**, *Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma*  
**Nicola De Stefano**, *Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche, Neurologiche,  
Metaboliche e dell'Invecchiamento, Dipartimento Medicina, Chirurgia e Neuroscienze,  
Università di Siena, Siena*

**Gioacchino Tedeschi**, *Centro di Alti Studi di Risonanza Magnetica SUN-FISM,  
Università degli studi della Campania 'Luigi Vanvitelli', Napoli*

# Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica



## Massimo Filippi

Neuroimaging Research Unit, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Le misure di risonanza magnetica (RM) dell'atrofia e la sua progressione nel tempo sono tra i metodi più studiati e accettati per quantificare la neurodegenerazione. È necessario migliorare le tecniche di analisi delle immagini in modo che l'atrofia del cervello intero, della sostanza grigia (GM) e talamica possano essere attendibilmente stimate come utili in ambito clinico per aiutare nelle decisioni di trattamento individualizzate. I risultati derivati da ampi set di dati di persone con SM e controlli sani che utilizzano queste tecniche potrebbero essere facilmente tradotti e utilizzati per altre condizioni neurodegenerative.

Dopo una fase iniziale di revisione della qualità dei dati strutturali di immagine di risonanza magnetica che sono già stati raccolti nell'ambito dell'iniziativa INNI, al fine di essere utilizzati per le misurazioni dell'atrofia, gli obiettivi del progetto sono:

1. confrontare i metodi disponibili per le misurazioni dell'atrofia del cervello intero e della GM e formulare linee guida per le procedure di acquisizione e analisi dell'atrofia a livello nazionale;
2. studiare le anomalie morfometriche nei pazienti con sclerosi multipla e definire le traiettorie longitudinali della loro progressione;
3. ottenere una segmentazione affidabile e automatica del talamo, confrontare i risultati con gli approcci automatici esistenti e formulare linee guida per la sua applicazione clinica.

Nel terzo anno di attività, per quanto riguarda l'obiettivo 1 sono state raccolte, dal database di INNI, le acquisizioni di immagini RM di 466 pazienti con SM e 279 controlli sani, incluse scansioni pesate in T1 e T2 ad alta risoluzione 3D. Centosettanta pazienti con SM e 48 controlli sani sono stati rivalutati dopo un anno di follow-up.

Abbiamo selezionato il software da confrontare per la quantificazione dell'atrofia dell'intero cervello e della GM. Abbiamo deciso di includere metodi ben performanti (SPM e strumento FSL-SIENA (x)) in base ai risultati otte-

nuti da un precedente studio del nostro gruppo, ma anche di tenere conto dei recenti progressi nella quantificazione dell'atrofia:

FSL-SIENA (x) -XL e Jim8 (<http://www.xinapse.com/>).

Per la valutazione dell'atrofia trasversale della GM, e del volume della sezione trasversale del cervello intero abbiamo trovato un accordo significativo tra i risultati di SPM-v12 e Jim-v8 sia per controlli sani ( $p < 0,001$ ) che per SM ( $p < 0,001$ ), mentre non è stato trovato alcun accordo significativo nei confronti tra SIENAX e SPM-v12 e Jim-v8. Gli stessi risultati sono stati confermati considerando ciascun Centro separatamente. Per la quantificazione dell'atrofia longitudinale della GM, SPM-v12 e Jim-v8 hanno mostrato un buon accordo per i pazienti con SM mentre è stato riscontrato un accordo inferiore per i risultati del volume della GM nei controlli.

Per l'obiettivo 2: valutazione trasversale dell'atrofia regionale, il confronto tra pazienti con SM e controlli ha identificato l'atrofia del talamo sinistro e destro, che si estende ad altri nuclei della GM profondi. L'atrofia coinvolgeva anche la corteccia cerebellare e diverse aree: temporale, occipitale, parietale e frontale.

Per quanto riguarda la valutazione longitudinale dell'atrofia regionale, 170 pazienti con SM e 48 controlli sani dal set di dati di base hanno avuto un'acquisizione di follow-up con immagini RM adatte per una valutazione longitudinale delle variazioni di volume cerebrale. Inoltre, l'analisi Voxel Based Morphometry (VBM) è stata eseguita su immagini 3D pesate in T1 di base per valutare l'atrofia regionale. Al basale, rispetto ai controlli sani, i pazienti con SM hanno mostrato un pattern diffuso di atrofia della sostanza grigia (GM). Al follow-up i pazienti con SM rispetto ai controlli presentavano un pattern esteso di atrofia della sostanza bianca (WM). L'aumento di EDSS era correlato in modo significativo con la progressione dell'atrofia in diverse regioni corticali, l'insula e il cervelletto

Per l'obiettivo 3: segmentazione automatica del talamo, è stato analizzato un sottoinsieme di 141 SMRR



(età media=38 anni, EDSS mediano=1,5, durata media della malattia=9,0 anni) e 69 controlli sani (età media=36 anni), con una risonanza magnetica 3D pesata in T1 e una RM diffusion weighted (DWI) è stata raccolta per ottenere una segmentazione automatica affidabile del talamo.

Per 136 SM e 31 controlli abbiamo anche raccolto le acquisizioni di follow-up a un anno. Successivamente sono state derivate mappe di anisotropia frazionaria (FA). Le immagini pesate 3DT1 e FA sono state utilizzate come input per la segmentazione talamica utilizzando il toolbox FSL-MIST, sviluppato per consentire la segmentazione

multimodale dei nuclei sottocorticali. È stato valutato l'uso di altri software che non richiedevano un set di dati di training: FSL-FIRST (FSL versione 5.0.9) e Freesurfer (versione 6.0). Al basale, tutti i software hanno mostrato un buon accordo significativo nei risultati del volume talamico e sono stati in grado di differenziare significativamente i pazienti con SM da quelli con HC ( $p < 0,001$ ). Al follow-up, FSL-MIST ha mostrato la più bassa variabilità e una migliore capacità di differenziare i pazienti con SM da HC.

## Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice

MRI measurements of atrophy and its progression over time are among the best-studied and accepted methods for quantifying neurodegeneration. There is a need to improve image analysis techniques in order that whole-brain, grey matter (GM) and thalamic atrophy can be reliably estimated to be of use in the clinical setting for helping in individualized treatment decisions. Importantly, results derived from large datasets of healthy control (HC) and MS patients using these techniques could be easily translated to other neurodegenerative conditions.

After an initial stage of revision, of the image quality of structural MRI data that are already collected within the INNI initiative, in order to be used for atrophy measurements, aims of the project are:

1. to compare a set of available state of art methods for whole-brain and GM atrophy measurements and to formulate guidelines for acquisition procedures and analysis of atrophy at a national level;
2. to study morphometric abnormalities in MS patient voxel-wise and to define the longitudinal trajectories of their progression;
3. to obtain a reliable, automatic segmentation of the thalamus, to compare the results with existing automatic approaches and to formulate guidelines for its clinical application.

In the third year of the project, for aim 1, baseline MRI acquisitions of 466 MS patients and 279 HC, including high resolution 3D T1 and T2 weighted scans were collected from the INNI repository. MRI scans were all acquired using 3.0T scanners. One-hundred seventy MS patients and 48 HC had a follow-up re-evaluation after one year.

We selected the software to be compared for the quantification of atrophy of the whole brain and the GM. We decided to include well-performing methods (SPM and FSL-SIENA(x) tool) according to the results obtained by

a previous study from our group, but also to take into account recent advances in atrophy quantification:

FSL-SIENA(x)-XL and Jim8 (<http://www.xinapse.com/>).

For the cross-sectional assessment of GM atrophy, and for the cross-sectional assessment of GM atrophy, we found a significant agreement between the results of SPM-v12 and Jim-v8 for both HC ( $p < 0.001$ ) and MS ( $p < 0.001$ ), while no significant agreement was found in the comparisons among SIENAX and both SPM-v12 and Jim-v8. The same results were confirmed by considering each Center separately. For longitudinal GM atrophy quantification, SPM-v12 and Jim-v8 showed a good agreement for MS patients while a lower agreement was found for GM volume results in HC.

For aim 2: cross-sectional assessment of regional atrophy, the comparison between MS patients and HC identified atrophy of left and right thalamus, extending to other deep GM nuclei. There was also atrophy involving the cerebellar cortex and several temporal, occipital, parietal and frontal areas. For the longitudinal assessment of regional atrophy, from the baseline dataset, 170 MS patients and 48 HC had a follow up acquisition with MR images suitable for a longitudinal assessment of brain volume changes. Moreover, Voxel Based Morphometry (VBM) analysis was performed on baseline 3D T1-weighted images to assess regional atrophy. Since the sample size characteristics were very unbalanced, with two centers without HC, the calibration maps obtained for all centers for the aim 2 of the project, were applied. At baseline, compared to HC, MS patients showed a diffuse pattern of regional GM atrophy. The pattern was comparable with that found for the whole dataset previously described. At follow-up, the MS patients had an extensive pattern of white matter (WM) atrophy. In the GM, the precentral gyri were significantly atrophied. Increase of EDSS was significant corre-

lated with atrophy progression in several cortical regions, the insula and cerebellum.

For aim 3: automatic segmentation of the thalamus a subset of 141 RRMS (mean age=38 years, median EDSS=1.5, mean disease duration=9.0 years,) and 69 HC (mean age=36 years,) from the previously mentioned dataset used for Aims 1 and 2, with a baseline 3D T1-weighted and a diffusion weighted (DW) MRI was collected to obtain a reliable automatic segmentation of the thalamus. For 136 MS and 31 HC we also collected the one-year follow-up acquisitions. Subsequently, fractional anisotropy (FA) maps were derived. 3DT1-weighted images and FA

were used as input for thalamic segmentation using the FSL-MIST toolbox, developed to allow multimodal segmentation of subcortical nuclei. The use of other approaches that did not require a training dataset was evaluated: FSL-FIRST (FSL version 5.0.9) and Freesurfer (version 6.0). At baseline, all software showed a good significant agreement in the results of thalamic volume, and able to significantly differentiate MS patients from HC ( $p < 0.001$ ). At follow-up, considering the results of the percentage thalamic volume change in HC, FSL-MIST showed the lowest variability and a better capability to differentiate MS patients from HC.

# Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con sclerosi multipla



**Nicola De Stefano**

*Dipartimento Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Siena*

Lavori recenti hanno mostrato correlazioni significative tra prestazioni insufficienti nei test cognitivi e perdita del volume dell'ippocampo nei pazienti con SM. Studi precedenti hanno utilizzato un approccio manuale o la segmentazione completamente automatizzata per ottenere volumi di ippocampo derivati da immagini RM. Entrambi questi approcci hanno pro e contro. Oltre alla perdita di tessuto, ci sono anche evidenze che nella SM ci sia un'espansione del giro dentato dell'ippocampo e che questa espansione sia correlata ai deficit della memoria e all'apprendimento visuo-spaziale nelle fasi più avanzate della malattia. In passato sono state condotte analisi utilizzando la segmentazione manuale in un piccolo gruppo di pazienti che dovrebbero essere confermate in una popolazione più ampia. Poiché la segmentazione manuale richiede molto tempo, sarebbe auspicabile un approccio automatico.

Gli obiettivi del progetto sono:

1. utilizzare una procedura semi-automatica implementata in laboratorio per valutare i volumi dell'ippocampo in persone con SM recidivante-remittente (RR) nelle prime fasi della malattia (durata della malattia <5 anni) per stabilire in un ampio set di dati multicentrico:
  - se i volumi dell'ippocampo delle persone con SMRR, nelle prime fasi di malattia, mostrano differenze con quelli dei controlli sani appaiati per età;
  - se volumi ippocampali ridotti sono correlati a deficit cognitivi, in particolare con deficit della memoria e della capacità visuo-spaziali o di memoria verbale;
  - se esiste una relazione temporale tra la diminuzione dei volumi dell'ippocampo al basale e l'alterazione della memoria / attenzione misurata con i test neuropsicologici al follow-up;
2. implementare un metodo automatico per la stima dei cambiamenti volumetrici del giro dentato dell'ippocampo e studiare i fattori che influenzano l'espansione del giro dentato dell'ippocampo nella SM.

I primi 12 mesi, di questo progetto triennale, sono stati dedicati alla selezione del set di dati di immagini RM da analizzare e al suo controllo di qualità. A questo proposito, abbiamo identificato circa 300 persone con SM in una fase iniziale di malattia. Su 100 di questi pazienti e circa 1.000 controlli precedentemente selezionati, abbiamo eseguito l'analisi su tutte le scansioni RM 3D pesate in T1 e attualmente stiamo eseguendo la correzione manuale delle maschere del volume dell'ippocampo di tutti i pazienti (obiettivo 2).

Nel corso del 2020 sono state ricevute, controllate per il controllo qualità e analizzate immagini 3D T1-W di 139 HC. Il database delle immagini analizzate da Siena è ora costituito da 279 maschere di ippocampo. Queste azioni rispondono al traguardo 1 e 2 del progetto.

Nel terzo anno del progetto è stato selezionato il set di dati MRI da analizzare ed è stato eseguito un controllo di qualità delle scansioni, FIRST è stato eseguito su tutte le scansioni MRI 3D pesate in T1 pre-elaborate per ottenere maschere volumetriche dell'ippocampo di tutti i soggetti, che sono state corrette manualmente.

I primi pazienti con SM hanno mostrato una diminuzione complessiva dei volumi dell'ippocampo totale, destro e sinistro rispetto all'HC, che era correlata alle prestazioni della memoria. È attualmente in corso un'analisi VBM per indagare se il danno ippocampale è ampiamente distribuito o è particolarmente localizzato in aree specifiche nei pazienti con SM.

L'analisi dell'immagine sarà completata entro la fine di dicembre, l'analisi statistica effettuata entro gennaio e una bozza del paper sarà finalizzata e diffusa entro marzo 2022.

# Large-scale, multi-centre assessment of hippocampal volume in MS patients

Recent works have shown significant correlations between poor performance in cognitive tests and loss of hippocampal volume in MS patients. Previous works have utilized either a manual approach or the fully automated segmentation to obtain MRI-derived hippocampal volumes. Both of these approaches have pros and cons. In addition to tissue loss, there is also evidence of hippocampal dentate gyrus expansion in MS and that this correlates with deficits in memory and visuospatial learning in the more advanced stages of the disease. Previous analysis was conducted using manual segmentation, in a relative small group of patients and need to be confirmed in a larger population. Since manual segmentation is time consuming, an automatic approach would be desirable.

Aims of the project were:

1. to use a semi-automated procedure to assess hippocampal volumes in RRMS patients at the early disease stages (disease duration < 5y) to establish in a large, multi-centre dataset:
  - whether hippocampal volumes of early RRMS show differences with those of age-sex matched HC;
  - whether decreased hippocampal volumes correlate with cognitive impairments, particularly with deficit involving memory and visuo-spatial or verbal memory abilities;
  - whether there is a temporal relationship between the decrease of hippocampal volumes at baseline and the alteration in memory/attention as measured with the neuropsychological tests at follow-up;
2. to implement an automatic method for estimation of volumetric changes of hippocampal dentate gyrus and investigate the factors influencing hippocampal dentate gyrus expansion in MS (in collaboration with Milan).

As planned, the first 12 months of this 36-month study have been dedicated to the selection of the MRI dataset to analyze and its quality control. In this respect, we identified about 300 MS patients with an early-stage of MS (First Milestone). On about 100 of these patients and about 1,000 previously selected HC, we run FIRST on all the preprocessed 3D T1-W MRI scans and we are presently performing the manual correction of hippocampal volume masks of all patients (part of the Second Milestone). During the second year: 3D T1-W images of 140 HC were received late in 2019, checked for quality control and analyzed, obtaining the hippocampus masks for each of them.

During 2020, T1-W 3D images of 139 HC were received, checked for quality control, and analyzed. The database of images analyzed by Siena is now constituted by 279 hippocampus masks. These actions respond to the Milestone 1 and 2 of the project.

During the third year the MRI dataset to analyze was selected and a quality control of the scans performed, FIRST was run on all the pre-processed 3D T1-weighted MRI scans to obtain hippocampal volume masks of all subjects, which were manually corrected.

Early MS patients showed an overall decrease of total, right and left hippocampal volumes compared to HC, which correlated with memory performance. A VBM analysis is currently ongoing, to investigate whether hippocampal damage is widely distributed or is particularly localized in specific areas in MS patients.

The image analysis will be completed by the end of December, the statistical analysis performed by January and a draft of the paper will be finalized and circulated by March 2022.

# L'impatto dei cambiamenti della connettività funzionale sulla progressione della malattia e l'accumulo di disabilità



**Patrizia Pantano**

*Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma*

La disabilità clinica e il carico di malattia in singoli pazienti con sclerosi multipla (SM) potrebbero non coincidere. Lo scopo del progetto è stato quello di validare un modello non lineare per spiegare nella SM la combinazione del danno strutturale, la riorganizzazione funzionale e l'accumulo di disabilità nel tempo in una vasta popolazione di persone con SM e collegare il modello alla connettività funzionale (FC) tra specifiche strutture cerebrali, al fine di:

1. valutare se l'esaurimento dei meccanismi funzionali adattativi corrisponde all'inizio dell'accumulo di disabilità;
2. individuare le strutture cerebrali per le quali il modello si adatta al meglio, come possibili bersagli terapeutici per la riabilitazione o la farmacoterapia.

Durante il primo e il secondo anno, abbiamo svolto i compiti programmati, quindi selezione di campioni, elaborazioni individuali, correlazioni, analisi delle proprietà globali, modelli e benchmark, risultati, discussione, report interni, preparazione di documenti e diffusione dei risultati. Abbiamo prodotto un paper che descrive lo studio dei correlati strutturali della FC del cervelletto sensomotorio in un campione di 144 pazienti con SM senza disabilità.

Questo progetto doveva durare 2 anni e il terzo anno è stato dedicato al perfezionamento delle analisi eseguite. Abbiamo ampliato l'analisi funzionale aggiungendo il cervelletto cognitivo e studiato le alterazioni della FC del cervelletto sia sensomotorio che cognitivo in pazienti con

EDSS < 1.5. Inoltre, abbiamo implementato un'analisi volta a verificare la consistenza delle alterazioni FC di entrambi i domini cerebellari. Abbiamo diviso casualmente i pazienti in due sottogruppi di 72 pazienti ciascuno e studiato le differenze dei sottogruppi rispetto allo stesso gruppo di controllo.

Poiché i modelli di alterazione di entrambi i domini cerebellari sono risultati simili tra i due sottogruppi, abbiamo potuto eseguire l'analisi delle alterazioni FC dell'intero gruppo di pazienti rispetto ai controlli. L'analisi di correlazione delle alterazioni della FC con i parametri strutturali ha suggerito che la perdita dell'integrità della fibra della sostanza bianca è associata alla diminuzione della FC, poiché la connettività strutturale rappresenta lo scheletro su cui passano le connessioni funzionali. D'altra parte, il volume corticale conservato è associato all'aumento della FC poiché l'integrità corticale rappresenta la struttura per l'aumento della FC. La versione modificata del manoscritto è stata inviata all'European Journal of Neurology. Inoltre, lo studio delle matrici ROI-to-ROI FC non ha rivelato differenze nelle proprietà di rete dei pazienti con EDSS < 1,5 rispetto ai controlli.

Infine, lo studio della FC cerebellare di 450 pazienti con SM con diversi livelli di disabilità non ha mostrato l'esaurimento dei meccanismi adattativi funzionali in corrispondenza dell'inizio dell'accumulo di disabilità, come avevamo ipotizzato.

# The impact of functional connectivity changes on disease progression and disability accumulation

Clinical disability and disease burden in single MS patients may not coincide. Therefore, there is the need to finalize and validate a model that combines structural damage, functional reorganization and disability over time.

The main aim of the project was to validate the model that combines structural damage, functional reorganization and disability in a large MS population and link the model to functional connectivity (FC) between specific brain structures, in order to:

1. evaluate whether the exhaustion of functional adaptive mechanisms corresponds to the begin of disability accumulation;
2. individuate brain structures for which the model fits at best, as possible of therapeutic targets for rehabilitation or pharmacotherapy.

During the first and second years, we accomplished the tasks requested by the Gantt chart, thus sample selection, individual processing, correlations, global properties analysis, models and benchmarks, results, discussion, internal reports, paper preparation and dissemination of results. We produced a manuscript describing the study of the structural correlates of FC of sensorimotor cerebellum in a sample of 144 MS patients with no disability.

This project was planned to last 2 years, and the third year was spent to refine the performed analyses. We widened the functional analysis adding the cognitive cerebellum as

a seed and investigated alterations of FC of both sensorimotor and cognitive cerebellum in patients with EDSS<1.5. Further, we implemented an analysis aimed at verifying the consistency of the FC alterations of both the cerebellar domains. We randomly divided patients into two subgroups of 72 patients each and investigated the subgroups' differences versus the same control group. Since the alteration patterns of both cerebellar domains resulted to be similar between the two subgroups, we could perform the analysis of FC alterations of the whole group of patients vs HC.

Correlation analysis of FC alterations with structural parameters suggested that loss of WM fiber integrity is associated with FC decrease, since structural connectivity represents the skeleton on which functional connections go through.

On the other hand, preserved cortical volume is associated with FC increase since cortical integrity represents the framework for the FC to increase. The modified version of the manuscript was submitted to European Journal of Neurology. Further, the study of the ROI-to-ROI FC matrices revealed no differences in network properties of patients with EDSS<1.5 vs HC.

Lastly, the study of cerebellar FC of 450 MS patients with different levels of disability did not show the exhaustion of functional adaptive mechanisms in correspondence of the begin of disability accumulation, as we had hypothesized.

# Determinanti RM strutturali e funzionali di disequilibrio cognitivo-radiologico in pazienti con SM



## Gioacchino Tedeschi

*Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche, Neurologiche, Metaboliche e dell'Invecchiamento & Centro di Alti Studi di Risonanza Magnetica SUN-FISM, Università degli studi della Campania 'Luigi Vanvitelli', Napoli*

Un'ampia percentuale di pazienti con sclerosi multipla presenta deficit cognitivi, con un coinvolgimento preminente dell'attenzione, della velocità di elaborazione delle informazioni, delle funzioni esecutive, della memoria e delle abilità visuo-spaziali.

L'uso della risonanza magnetica (RM) come misura di outcome nella pratica clinica, o anche come fattore prognostico, assume una stretta relazione tra le anomalie cerebrali misurate con la RM convenzionale e lo stato cognitivo nei pazienti con SM. Tuttavia, l'associazione tra prestazioni cognitive e misure derivate dalla risonanza magnetica del danno al tessuto cerebrale nella sclerosi multipla è più scarsa del previsto e deve essere meglio chiarita.

In questo studio, abbiamo utilizzato il set di dati multicentrico 3T-RMI di INNI per estrarre dati multimodali di 540 pazienti con SM. Abbiamo sviluppato una pipeline avanzata di apprendimento automatico per identificare le caratteristiche RM strutturali del cervello che, insieme ai dati demografici e clinici, predicono le prestazioni della velocità di elaborazione delle informazioni dei pazienti con SM. Abbiamo convalidato e testato potenti stimatori supervisionati seguendo un rigoroso schema di convalida per ottenere previsioni robuste e affidabili delle prestazioni cognitive.

Abbiamo eseguito sia una classificazione che un'attività di regressione basata sui punteggi del test SDMT alimentando ciascun modello con diverse combinazioni di funzionalità. I nostri risultati hanno mostrato buone prestazioni e hanno confermato che il danno delle strutture della sostanza grigia rilevanti, come il talamo e l'ippocampo, potrebbe essere il predittore più rilevante delle prestazioni cognitive nella SM.

Abbiamo già pianificato, nello stesso ampio campione di pazienti, di integrare/ampliare questo primo studio di "RM strutturale" con dati di risonanza magnetica funzionale (fMRI). In particolare, abbiamo iniziato a estrarre, armonizzare e analizzare i dati fMRI a riposo (RS-fMRI) al fine di selezionare quali metriche RS-fMRI possano migliorare la previsione delle prestazioni cognitive nei soggetti con SM, aiutando a chiarire ulteriormente il mismatch cognitivo-radiologico osservato e per sviluppare biomarcatori RM strutturali e funzionali utili a monitorare lo sviluppo del deterioramento cognitivo e gli interventi riabilitativi.



# Structural and functional MRI determinants of cognitive-radiological mismatch in MS patients

---

A large proportion of multiple sclerosis (MS) patients experience cognitive deficits, with prominent involvement of attention, information processing speed, executive functions, memory and visuo-spatial abilities. The use of MRI as an outcome measure in clinical practice, or even as a prognostic factor, assumes a close relationship between the extent of MRI-measured brain abnormalities and the cognitive status in MS patients. However, the association between cognitive performances and MRI-derived measures of brain tissue damage in MS is poorer than expected and needs to be better clarified.

In this study, we used the multicenter 3T-MRI dataset of the INNI to extract multimodal data of 540 MS patients. We developed an advanced machine learning pipeline to identify brain structural MRI features that, along with demographic and clinical data, predict information processing speed performance of MS patients. We trained, validated, and tested powerful supervised estimators following a rigorous validation scheme to obtain robust and reliable generalization performance of cognitive performance prediction.

We carried out both a classification and a regression task based on SDMT scores feeding each model with different combinations of features. Our results showed good performance and confirmed that damage of relevant GM structures, such the thalamus and hippocampus, might be the more relevant predictor of cognitive performance in MS. We have already planned – in the same large sample of patients - to integrate/expand this first “structural MRI” study with functional MRI (fMRI) data. In particular, we have started to extract, harmonize and analyze resting-state fMRI (RS-fMRI) data in order to select which RS-fMRI metrics can improve the prediction of cognitive performance in MS subjects, helping to further clarify the observed/well-known cognitive-radiological mismatch and to develop structural e functional MRI biomarkers useful to monitor cognitive impairment development and rehabilitative interventions.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Papers

- Storelli L, Rocca MA, Pantano P, Pagani E, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratin P, Filippi M, for the INNI Network. MRI quality control for the Italian Neuroimaging Network Initiative: moving towards big data in multiple sclerosis. *J Neurol* 2019; 266:2848-2858; doi: 10.1007/s00415-019-09509-4] IF: 3.956
- Pagani E, Rocca MA, De Meo E, Horsfield MA, Colombo B, Rodegher M, Filippi M. Structural connectivity in multiple sclerosis and modelling of disconnection. *Mult Scler J* 2020; 26: 220-232 doi: 10.1177/1352458518820759] IF: 6.312
- Cordani C, Meani A, Esposito F, Valsasina P, Colombo B, Pagani E, Preziosa P, Comi G, Filippi M, Rocca MA. Imaging correlates of hand motor performance in multiple sclerosis: a multiparametric structural and functional MRI study. *Mult Scler J* 2020; 26: 233-244; doi: 10.1177/1352458518822145] IF: 6.312
- Riccitelli GC, Pagani E, Meani A, Valsasina P, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Cognitive impairment in benign multiple sclerosis: a multiparametric structural and functional MRI study. *J Neurol* 2020; 267: 3508-3517 [epub ahead of print 2 July 2020. doi: 10.1007/s00415-020-10025-z] IF: 4.849
- Cordani C, Hidalgo de la Cruz M, Meani A, Valsasina P, Esposito F, Pagani E, Filippi M, Rocca MA. MRI correlates of clinical disability and hand-motor performance in multiple sclerosis phenotypes. *Mult Scler J* 2021; 27: 1205-1221. doi: 10.1177/1352458520958356] IF: 6.312
- Rocca MA, Valsasina P, Meani A, Pagani E, Cordani C, Cervellin C, Filippi M. Network damage predicts clinical worsening in multiple sclerosis: a 6.4-year study. *Neurology Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021; 8:e1006; doi: 10.1212/NXI.0000000000001006] IF: 8.485
- Hidalgo de la Cruz M, Valsasina P, Sangalli F, Esposito F, Rocca MA, Filippi M. Dynamic functional connectivity in the main clinical phenotypes of multiple sclerosis. *Brain Connect* 2021; 11: 678-690; doi: 10.1089/brain.2020.0920] IF: 2.262
- Storelli L, Azzimonti M, Gueye M, Tedeschi G, De Stefano N, Pantano P, Filippi M, Rocca MA. A deep-learning approach to predicting disease progression in multiple sclerosis using magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2021 (in press) IF: 6.016
- Pagani E, Storelli L, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Rocca MA, Filippi M, for the INNI Network. Regional analysis of brain atrophy in multiple sclerosis in a large harmonized multicenter study (submitted to *Neurology*)
- Tommasin S, Iakovleva V, Gianni C, Rocca MA, Tedeschi G, De Stefano N, Pozzilli C, Filippi M, Pantano P, and the INNI network. Relation of sensorimotor and cognitive cerebellar functional connectivity with brain structural damage in patients with multiple sclerosis and no disability. (submitted to *European Journal of Neurology*)

### Abstracts

- Rocca MA, Riccitelli GC, Meani A, Preziosa P, Comi G, Filippi M. Cognitive impairment in benign MS: a multiparametric structural and functional MRI study. *Mult Scler J* 2018; 24 (S2): 239 (ECTRIMS 2018)
- Rocca MA, Valsasina P, Colombo B, Martinelli V, Falini A, Comi G, Filippi M. Modulation of cortico subcortical functional connectivity occurs after symptomatic treatment of fatigue in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2018; 24 (S2): 317-318 (ECTRIMS 2018)
- Cordani C, Meani A, Esposito F, Radaelli M, Colombo B, Comi G, Filippi M, Rocca MA. Mapping the imaging correlates of hand motor performance in multiple sclerosis: a combined structural and functional MRI study. *Mult Scler J* 2018; 24 (S2): 410-411 (ECTRIMS 2018)
- Rocca MA, Riccitelli GC, Meani A, Preziosa P, Filippi M. Cognitive impairment in benign multiple sclerosis: a multiparametric structural and functional MRI study. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S20 (SIN 2018)
- Rocca MA, Valsasina P, Colombo B, Martinelli V, Falini A, Comi G, Filippi M. Modulation of cortico-subcortical functional connectivity occurs after symptomatic treatment of fatigue in patients with multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S283-S284 (SIN 2018)
- Cordani C, Meani A, Esposito F, Radaelli M, Colombo B, Filippi M, Rocca MA. Imaging correlates of hand motor performance in multiple sclerosis: a multiparametric structural and functional MRI study. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S296-S297 (SIN 2018)
- Filippi M, Meani A, Cervellin C, Valsasina P, Cordani C, Pagani E, Preziosa P, Rocca MA. Structural and functional damage of the sensorimotor network contribute to predict disability progression and phenotype evolution in patients with multiple sclerosis: a 6.5-year follow-up study. *Neurology* 2019; 92 (15 Supplement): S49.004 (AAN 2019)
- Storelli L, Rocca MA, Pagani P, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratin P, Filippi M. Integration and characterization of brain MRI data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the study of multiple sclerosis. *Neurology* 2019; 92 (15 Supplement): P5.2-034 (AAN 2019)



- Storelli L, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M, Rocca MA. Integration and Characterization of Brain MRI Data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the Study of Multiple Sclerosis. OSR Scientific Retreat, Baveno, 14-16 marzo 2019, poster 276, page 114
- Filippi M, Storelli L, Meani A, Cervellin C, Valsasina P, Cordani C, Pagani E, Preziosa P, Rocca MA. Structural and functional damage of the sensorimotor network contribute to predict disability progression and phenotype evolution in patients with multiple sclerosis: a 6.5-year follow-up study. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2019; 27: 3152
- Preziosa P, Rocca MA, Riccitelli GC, Pagani E, Meani A, Valsasina P, Filippi M. Relationship between cognitive impairment and MRI brain abnormalities in benign multiple sclerosis: a multiparametric study. *IMSCOGS 2019*. Amsterdam, 6-7 June 2019
- Riccitelli GC, Rocca MA, Pagani E, Meani A, Preziosa P, Valsasina P, Filippi M. Relationship between cognitive impairment and MRI brain abnormalities in benign multiple sclerosis: a multiparametric study. *Eur J Neurol* 2019; 26 (Suppl 1): 288 (EAN 2019)
- Storelli L, Rocca MA, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M. Integration and Characterization of Brain MRI Data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the Study of Multiple Sclerosis. Accepted as e-presentation at the 5th EAN Congress - Oslo, 29th June-2nd July 2019
- Filippi M, Meani A, Cervellin C, Valsasina P, Cordani C, Pagani E, Preziosa P, Rocca MA. Structural and functional damage of the sensorimotor network contribute to predict disability progression and phenotype evolution in patients with multiple sclerosis: a 6.5-year follow-up study. *Mult Scler J* 2019; 25 (S2): 284-285 (ECTRIMS 2019)
- Storelli L, Rocca MA, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M. Integration and characterization of brain MRI data from the Italian neuroimaging network initiative (INNI) for the study of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2019; 25 (S2): 480 (ECTRIMS 2019)
- Storelli L, Rocca MA, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M. Integration and characterization of brain MRI data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the study of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2019; 40 (Suppl October 2019): S286-S287 (SIN 2019)
- Rocca MA, Meani A, Cervellin C, Valsasina P, Cordani C, Pagani E, Preziosa P, Filippi M. Structural and functional damage of the sensorimotor network contribute to predict disability progression and phenotype evolution in patients with multiple sclerosis: a 6.5 follow-up study. *Neurol Sci* 2019; 40 (Suppl October 2019): S317-S318 (SIN 2019)
- Hidalgo de la Cruz M, Valsasina P, Sangalli F, Esposito F, Filippi M, Rocca MA. Characterizing dynamic functional connectivity in the main clinical phenotypes of multiple sclerosis (1310). *Neurology* 2020; 94 (15 Supplement): P2.1-005 (AAN 2020)
- Mistri D, Meani A, Tedeschi G, Pantano P, Zaratini P, De Stefano N, Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Impact of multiple sclerosis on cognitive aging: a multicenter study. *Mult Scler J* 2020; 26 (S3): 505-506 (ECTRIMS 2020)
- Mistri D, Meani A, Tedeschi G, Pantano P, Zaratini P, De Stefano N, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Impact of multiple sclerosis on cognitive aging: a multicenter study. IX Congresso Società Italiana di Neuropsicologia, 20-21 novembre 2020
- Marzi C, Biseco A, d'Ambrosio A, Diciotti S, Altieri M, Battaglini M, De Stefano N, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Rocca MA, Storelli L, Filippi M, Gallo A, Tedeschi G, and the Italian Neuroimaging Network Initiative. Structural MRI determinants of cognitive-radiological mismatch in MS patients. Congresso Scientifico Annuale Associazione Italiana Sclerosi Multipla e la sua Fondazione - Roma 26-27 novembre 2020
- Mistri D, Meani A, Tedeschi G, Pantano P, Zaratini P, De Stefano N, Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Impact of multiple sclerosis on cognitive aging: a multicenter study. *Neurol Sci* 2020; 41 (Suppl 1): S279 (SIN 2020)
- Mistri D, Meani A, Tedeschi G, Pantano P, Zaratini P, De Stefano N, Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Impact of multiple sclerosis on cognitive aging: a multicenter study. *Neurology* 2021; 96 (15 supplement): 2556 (AAN 2021)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: application to the multicenter INNI dataset. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 418 (EAN 2021)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: Application to the multicenter INNI dataset. *J Neurol Sci* 2021; 429: 96 (118291) doi:10.1016/j.jns.2021.118291 (WCN/SIN 2021)
- d'Ambrosio A, Marzi C, Biseco A, Diciotti S, Altieri M, Battaglini M, De Stefano N, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Rocca MA, Storelli L, Filippi M, Tedeschi G, Gallo A, Italian Neuroimaging Network Initiative. Selecting structural MRI predictors of cognitive status in MS patients through a machine learning approach applied to a large multicenter MS population. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 85-86 (ECTRIMS 2021)



- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratin P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: application to the multicenter INNI dataset. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 398 (ECTRIMS 2021)
- Luchetti L, Battaglini M, Leoncini M, Cortese R, Stromillo ML, Inderyas M, Gentile G, Gallo A, Tedeschi G, Ruggieri S, Pantano P, Pagani E, Rocca MA, Filippi M, De Stefano N, INNI working group. Hippocampal atrophy is relevant to memory deficits in early Relapsing Remitting MS patients. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 401-402 (ECTRIMS 2021)
- Pagani E, Storelli L, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratin P, Rocca MA, Filippi M. Regional analysis of atrophy in multiple sclerosis in a large multicenter dataset. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 435-436 (ECTRIMS 2021)

**Fondi totali: 865.790 € per 3 anni (642.640 € per l'infrastruttura; 223.150 € per progetti specifici)**

Total fund: € 865,790 for 3 years (€ 642,640 for infrastructure; € 223,150 for specific projects)



**PROGETTI DI RICERCA  
E BORSE DI STUDIO FINANZIATI  
DA FISM 2021, 2020**

FUNDED RESEARCH PROJECTS  
AND FELLOWSHIPS 2021, 2020

---

# Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2021

## FISM funded research projects and fellowships 2021

### COVID-19 E SM / COVID-19 AND MS

#### Marco Salvetti

Sapienza Università di Roma,  
Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale  
e Organi di Senso, Roma

#### **SARS-CoV-2 e sclerosi multipla: l'interazione è iniziata? Studio sull'impatto dell'infezione e della vaccinazione sullo sviluppo di sclerosi multipla**

SARS-CoV-2 and multiple sclerosis: has the interplay started? A study on the impact of infection and vaccine on the development of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 559.500 - 3 anni / years

#### Francesco Cucca

Università degli Studi di Sassari,  
Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

#### **Impatto dei fattori genetici e dei farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla sulle risposte immunitarie cellulari e umorali dopo la vaccinazione contro Sars-Cov-2**

Impact of genetic factors and drugs used in the treatment of multiple sclerosis on cellular and humoral immune responses after vaccination against Sars-Cov-2

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 350.000 - 2 anni / years

#### Andrea Cossarizza

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,  
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche  
Materno-Infantili e dell'Adulto, Modena

#### **Ruolo e la funzionalità delle cellule T specifiche per SARS-CoV-2 in pazienti con sclerosi multipla vaccinati**

Unravelling the role and functionality of T cells in treated multiple sclerosis SARS-CoV-2 vaccinated patients

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 225.000 - 2 anni / years

#### Massimo Filippo

Fondazione Centro San Raffaele,  
Unità di Neurologia e Unità di Ricerca in Neuroimaging,  
Milano

#### **COVID-19 nelle persone con sclerosi multipla: impatto su attività della malattia, progressione, profili neuropsichiatrici e aspetti immunologici. Lo studio DISCERNING**

COVID-19 in people with multiple SCLEROSIS: impact on disease activity, progression, Neuropsychiatric profile and Immunological features. The DISCERNING study.

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 1 anno / year

# Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2020

## FISM funded research projects and fellowships 2020

### NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

#### Franca Deriu

Università degli Studi di Sassari,  
Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

#### Misurazione dell'impatto di comuni programmi di esercizio sulla fatica soggettiva e oggettiva durante le attività della vita quotidiana in persone con sclerosi multipla

Measuring the impact of common exercise programs on subjective and objective fatigue during daily living activities in people with multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 118.314 - 2 anni / years

#### Marco Cambiaghi

Università degli Studi di Verona, Neuroscienze,  
Biomedicina e Movimento, Verona

#### Depressione e sclerosi multipla: uno studio pilota per esaminare gli effetti della tDCS sull'interazione neurone-glia nel modello EAE

Depression and multiple sclerosis: a pilot study to explore the effects of tDCS on neuro-glia interaction in the EAE model

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 25.650 - 1 anno / year

#### Francesco Pagnini

Università Cattolica del Sacro Cuore di Milano,  
Dipartimento di Psicologia, Milano

#### Il ruolo delle aspettative di malattia nella sclerosi multipla

The Role of Illness Expectations in the Course of Multiple Sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 59.400 - 2 anni / years

#### Micaela Porta

Università degli Studi di Cagliari,  
Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e dei Materiali, Monserrato (Cagliari)

#### Un approccio quantitativo per il monitoraggio della capacità fisica e della salute occupazionale in donne affette da sclerosi multipla

Women at work! A quantitative approach to monitor physical capability and occupational health in women with multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 58.000 - 2 anni / years

#### Alessandra Solari

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta,  
Direzione Scientifica, Servizio di Neuroepidemiologia,  
Milano

#### Pianificazione Condivisa delle Cure nella Sclerosi Multipla: Studio pilota (ConCure-SM Phase 2 Study)

Advance Care Planning in Multiple Sclerosis: Pilot study (ConCure-SM Phase 2 Study)

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 89.187 - 2 anni / years

### PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

#### Roberto Bergamaschi

IRCCS Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino e  
Università degli Studi di Pavia, Centro Sclerosi Multipla,  
Pavia

#### L'inquinamento Atmosferico come Possibile trigger di Infiammazione nella sclerosi multipla (API)

Air Pollution as a possible trigger of Inflammation in multiple sclerosis (API)

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 65.843 - 2 anni / years



## Irene Cantone

Università degli Studi di Napoli "Federico II",  
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie  
Mediche, Napoli

### **Comprendere le origini genetiche ed epigenetiche delle differenze tra i sessi nella Sclerosi Multipla mediante lo studio dell'inattivazione del cromosoma X umano**

Understanding Sex-Bias in Multiple Sclerosis by human X chromosome inactivation

Borsa alla Carriera Rita Levi Montalcini / Rita Levi Montalcini Career Fellowship

€ 359.250 - 3 anni / years

## Bruno Gran

Nottingham University Hospitals, NHS Trust,  
Queen's Medical Centre, Nottingham, UK

### **Interazione tra la risposta immunitaria a CMV e EBV nella sclerosi multipla**

Interaction between the immune response to CMV and EBV in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 215.388 - 2 anni / years

## Enzo Tramontano

Università degli Studi di Cagliari,  
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente, Cagliari

### **Identificazione di singoli loci HERV-W espressi differenzialmente nei pazienti affetti da sclerosi multipla come biomarcatori specifici e bersagli terapeutici innovativi**

Identification of individual HERV-W loci differentially expressed in multiple sclerosis patients as specific biomarkers and innovative therapeutic targets

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

## Rachele Bigi

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Neuroscienze  
Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, Roma

### **Ricerca di effettori decisivi delle alterazioni del regoloma nella SM: disregolazione LMP1-mediata di AID nella patogenesi della SM**

Looking for final effectors or regulome alterations in MS: LMP1-mediated dysregulation of AID in MS pathogenesis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

## Roberta Brambilla

University of Miami, Neurological Surgery, The Miami Project  
To Cure Paralysis, Miami, FL (US)

### **Disfunzione cognitiva nella sclerosi multipla: ruolo del TNFR2 signaling astrocitario**

Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: role of astroglial TNFR2 signaling

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 201.193 - 3 anni / years

## Elisabetta Volpe

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Neuroimmunologia  
Molecolare, Roma

### **Astrociti e Interleuchina-9: un nuovo asse che regola neuroinfiammazione e neurodegenerazione in sclerosi multipla progressiva?**

Astrocytes and interleukin-9: a novel axis regulating neuroinflammation and neurodegeneration in progressive multiple sclerosis?

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 120.000 - 3 anni / years

## Roberto Furlan

Istituto Scientifico San Raffaele, Istituto di Neurologia  
Sperimentale - INSpe, Unità di Neuroimmunologia Clinica,  
Milano

### **Neutrofili immunoregolatori in neuroinfiammazione**

Immunoregulatory neutrophils during neuroinflammation

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 240.000 - 3 anni / years

## Mario Galgani

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto  
per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale  
"G. Salvatore", Napoli

### **Cellule regolatorie TR3-56: un nuova popolazione cellulare nella patogenesi della sclerosi multipla**

Regulatory TR3-56 cells: unexplored immune cell population in the pathogenesis of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 160.000 - 3 anni / years

## Matilde Inglese

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Neurologia, Genova

### **Indagine sui meccanismi patogenetici associati alla depressione nella sclerosi multipla: disconnettività funzionale e strutturale dei nuclei neurotrasmettitoriali**

Exploring pathogenic mechanisms associated with depression in multiple sclerosis: functional and structural disconnectivity of neurotransmitter-related nuclei

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 160.125 - 2 anni / years

## **DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE**

## Sirio Cocozza

Università "Federico II" di Napoli, Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Napoli

### **Imaging quantitativo di ferro e mielina come indici di progressione di malattia in pazienti affetti da sclerosi multipla: uno studio longitudinale clinico e di risonanza magnetica**

Quantitative biomarkers of iron and myelin concentration as indices of disease progression in MS: a longitudinal clinical and MRI study

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 127.292 - 3 anni / years

## Francesca De Vito

IRCCS Neuromed, Istituto Neurologico Mediterraneo, Unità di Neurologia, Pozzilli (IS)

### **I microRNA circolanti nel liquido cerebrospinale come potenziali biomarkers della progressione della malattia mediata dalla sinaptopatia nella sclerosi multipla**

MicroRNAs in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship  
€ 68.000 - 2 anni / years

## Mario Picozza

Fondazione Santa Lucia IRCCS, Unità di Neuroimmunologia, Roma

### **Tutto in una goccia: studio dei correlati immunitari di efficacia, meccanismo ed effetti collaterali delle terapie contro la SM in citometria ad alta dimensionalità su prelievo capillare**

Every Drop is Sacred (EDSS): searching for immune correlates of efficacy, mode-of-action and side effects of MS drugs by high-dimensional cytometry on finger prick-derived capillary blood

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 62.000 - 2 anni / years

## **VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS**

## Loretta Tuosto

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Roma

### **Il CD28 come bersaglio di una strategia terapeutica per prevenire le risposte infiammatorie dei linfociti T helper indotte dai superantigeni virali e batterici nei pazienti con SM**

Selective targeting of CD28 costimulatory molecules as a therapeutic strategy for preventing inflammatory responses of T helper cells induced by viral and bacterial superantigens in MS patients

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

## Mario Alberto Ugo Stampanoni Bassi

IRCCS Neuromed, Neurologia e Neuroriabilitazione, Pozzilli (IS)

### **Effetti dei farmaci anti-CD20 sull'eccitotossicità sinaptica dipendente dalle cellule T nella sclerosi multipla**

Effects of anti-CD20 therapy on T lymphocyte-dependent synaptic excitotoxicity in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 55.274 - 2 anni / years

## Francesca Ronchi

University of Bern, Department for BioMedical Research, Bern (Switzerland)

### **L'asse intestino-cervello: come il microbiota e la dieta influenzano lo sviluppo e la protezione da sclerosi multipla**

The gut-brain axis: How microbiota and diet influence multiple sclerosis development and protection

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 200.000 - 3 anni / years

## Daniela Marasco

Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Farmacia, Napoli

### **Progettazione e studi funzionali dell'efficacia terapeutica di nuovi mimetici di SOCS1 nella sclerosi multipla**

Design and functional investigations of the therapeutic efficacy of novel SOCS1 mimetics in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 29.400 - 1 anno / year

## Placido Illiano

University of Miami, Miller School of Medicine, Department of Neurosurgery, The Miami Project to Cure Paralysis, Miami FL (US)

### **Studio dei meccanismi protettivi del recettore TNFR2 oligodendrocitario per la terapia della sclerosi multipla**

Investigating the mechanisms of protective TNFR2 signaling in oligodendrocytes: implications for multiple sclerosis therapy

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship  
€ 145.500 - 3 anni / years

## Stefano Previtali

Ospedale San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Divisione di Neuroscienze, Milano

### **Modulare i meccanismi di senescenza per ridurre i processi neurodegenerativi nella sclerosi multipla progressiva**

Targeting senescence to revert neurodegeneration in a mouse model of progressive MS

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 294.000 - 3 anni / years

## Giuseppe Cappellano

Ospedale San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Divisione di Neuroscienze, Milano  
Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

### **Legame di osteopontina al suo nuovo recettore ICOSL: caratterizzazione funzionale di tale interazione nell'EAE**

Binding of osteopontin to its newly identified receptor ICOSL: exploring their Relevance and Activity IN EAE (BRAIN-EAE)

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 29.800 - 1 anno / year

## Carlotta Granchi

Università di Pisa, Dipartimento di Farmacia, Pisa

### **Il sistema endocannabinoide come bersaglio per combattere la sclerosi multipla: degradazione della monoacilglicerolo lipasi da parte dei PROTACs**

Targeting the endocannabinoid system to fight multiple sclerosis: monoacylglycerol lipase degradation by PROTACs

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year



**COMITATO SCIENTIFICO FISM  
2021, 2020**

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE  
2021, 2020

---

# FISM “COVID-19 and MS” *ad hoc* commission, 2021

---

## **Abrignani Sergio**

*Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità  
Università degli Studi di Milano, Milano*

## **Battaglia Mario Alberto**

*Presidente Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova*

## **Castelli Francesco**

*Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali,  
ASST-Spedali Civili di Brescia, Università degli Studi di Brescia, Brescia*

## **Falautano Monica**

*Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, Milano*

## **Furlan Roberto**

*Unità di Neuroimmunologia Clinica, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano*

## **Gasperini Claudio**

*Direttore UOC di Neurologia e Neurofisiopatologia - Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma*

## **Matarese Giuseppe**

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli*

## **Mattoscio Miriam**

*Imperial College London, London UK*

## **Sastre-Garriga Jaume**

*Neurology-Neuroimmunology Department, Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat), Barcelona, Spain*

## **Vineis Paolo**

*MRC Centre for Environment and Health, School of Public Health, Imperial College London, London  
Visiting Professor, Italian Institute of Technology, Genova Italy*

# Biomedical Research FISM Scientific Committee, 2020

---

## **Roberta Brambilla**

*University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis,  
Miller School of Medicine, Miami US*

## **Gabriela Constantin**

*Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona, Verona*

## **Francesco Cucca**

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari*

## **Massimiliano Di Filippo**

*Centro Malattie Demyelinizzanti e Laboratori di Neurologia Sperimentale,  
Clinica Neurologica, Università degli Studi di Perugia, Perugia*

## **Roberto Furlan**

*Unità di Neuroimmunologia Clinica, Istituto di Neurologia Sperimentale,  
Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano*

## **Matilde Inglese**

*DINOEMI, Università degli Studi di Genova, Genova  
Mount Sinai School of Medicine – New York, USA*

## **Catherine Lubetzki**

*Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, Paris France*

## **Giuseppe Matarese**

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche,  
Università di Napoli "Federico II", Napoli*

## **Miriam Mattosco**

*Imperial College London, London UK*

## **Stefano Previtali**

*Ospedale San Raffaele, Milano*

## **Giovanni Ristori**

*Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze,  
Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, Ospedale Sant'Andrea,  
Sapienza Università di Roma, Roma*

## **Antonio Scalfari**

*Imperial College London, London UK*

## **Claudia Verderio**

*CNR, Istituto di Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano*

# Social & behavioural science research FISM Scientific Committee, 2020

---

## **Roberto Bergamaschi**

*Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C Mondino, IRCCS, Pavia*

## **Marco Bove**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES),  
Università degli Studi di Genova, Genova*

## **Monica Falautano**

*Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, Milano*

## **Luca Prosperini**

*Dipartimento Neuroscienze, U.O.C. Neurologia e Neurofisiopatologia,  
Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma*

## **Maria Assunta Rocca**

*Fondazione San Raffaele, Milano*

## **Jaume Sastre-Garriga**

*Neurology-Neuroimmunology Department,  
Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat), Barcelona, Spain*

## **Anders Guldhammer Skjerbæk**

*Development Manager Msc, Physiotherapist, MS Hospitals in Denmark*



AISM, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, è l'unica organizzazione in Italia che si occupa in modo strutturato e organico di tutti gli aspetti legati alla sclerosi multipla (SM), attraverso una prospettiva d'insieme che abbraccia il tema dei diritti delle persone con SM, i servizi sanitari e socio-sanitari, la promozione, l'indirizzo e il finanziamento della ricerca scientifica. Per la ricerca, per individuare terapie e trattamenti efficaci a rallentare il decorso della malattia e per trovare, domani, una cura risolutiva, mettiamo in campo tutte le risorse, grazie anche, dal 1998, al lavoro della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM). In questi ultimi 20 anni lo scenario di chi affronta ogni giorno la SM è molto cambiato, grazie all'impatto positivo di farmaci e interventi terapeutici. A determinare questo risultato ha concorso la nostra capacità di indirizzare la ricerca scientifica verso l'eccellenza e l'innovazione, a livello nazionale e internazionale.

*AISM (Italian Multiple Sclerosis Society) is the national charity in Italy on Multiple Sclerosis (MS) whose vision is a world free from MS. It was founded in 1968 by a group of people with MS and their families, neurologists, social workers and volunteers. AISM mission is to act globally to promote, drive and finance scientific research on MS; to promote and provide national and local services for people with MS; to represent and defend rights of people with MS. AISM, through its Foundation, FISM (Italian Multiple Sclerosis Foundation), is the leading funding agency of research in MS field in Italy to better understand the causes of the illness, to improve the quality of life of people with MS, to provide better treatment towards a definitive cure for a MS. The research portfolio includes intramural research (performed in rehabilitation and public health) and extramural research (performed in neurobiology, genetic, neuroimmunology, neuroimaging, biomarkers, experimental models and new therapies) through an annual call for proposals conducted by to universities, public and not-for-profit research institutes in Italy and Italian top researchers.*

Numero Verde AISM

**800.80.30.28**

**[www.aism.it](http://www.aism.it)**