

La ricerca sulla sclerosi multipla

Research on multiple sclerosis

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

COMPENDIO 2020

**SCLE
ROSI**
**MULT
IPLA**
ONLUS
associazione
italiana

un mondo
libero dalla SM

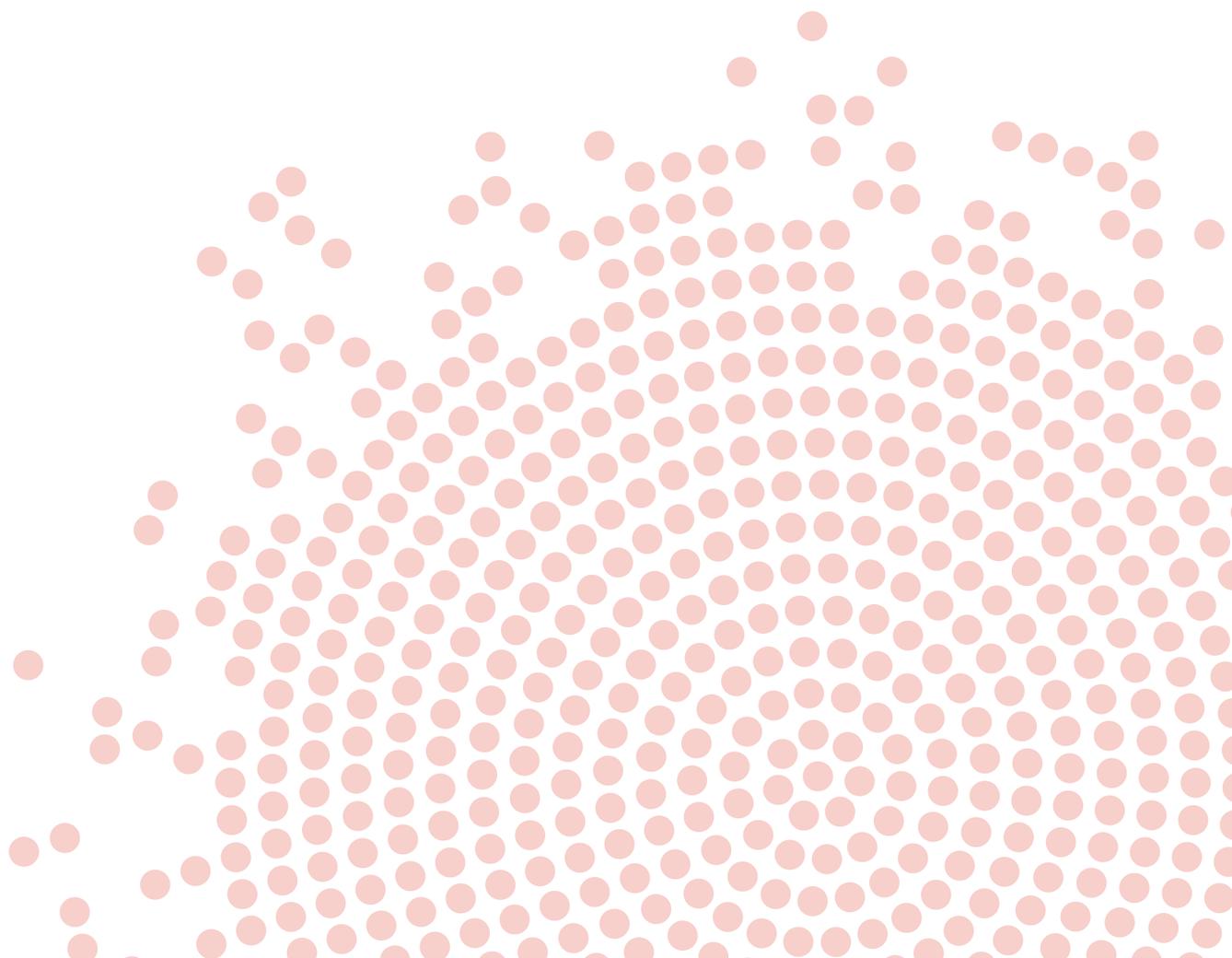
AISM. INSIEME, UNA CONQUISTA DOPO L'ALTRA

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 Onlus

A cura di:

Roberta Guglielmino

Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Progetto e coordinamento editoriale:

Manuela Capelli

Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Per la traduzione dell'introduzione si ringrazia

Michele Messmer Ucelli

Copyright FISM 2020

Pubblicato e distribuito da:

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus

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 Forno

ISBN 978-88-7148-150-0

Introduzione / Introduction

Siamo tutti connessi, tutti ugualmente persone, fragili ed eroici, tutti con un insuperabile attaccamento alla vita. Nei tempi dell'emergenza coronavirus, una delle lezioni che non dimenticheremo più è questa: la ricerca di eccellenza è un diritto primario e, insieme, è un dovere collettivo.

Noi che siamo coinvolti nel mondo della sclerosi multipla, noi che siamo sempre in emergenza e da sempre facciamo ricerca per fronteggiarla efficacemente, abbiamo oggi nelle mani e avremo in futuro una bussola preziosa per tutti, insieme al dovere di impedire a tutti di dimenticare quanto decisiva e vitale sia la ricerca, sempre.

Certo, mentre va in stampa questa introduzione al Compendio - che presenta i 28 progetti di ricerca conclusi quest'anno e i 21 progetti speciali ancora in corso -, i laboratori di ricerca clinica sono bloccati, gli spostamenti impediti. Ma la ricerca non si ferma, come non si ferma la sclerosi multipla.

Le connessioni che abbiamo costruito in tanti anni sono più salde e vitali che mai. Per questo non è una coincidenza casuale il fatto che il Congresso della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla si intitoli "Connecting MS": è un invito a tutti gli attori coinvolti, noi per primi, a essere co-responsabili dell'impatto della ricerca sulla persona e sulla società. Le strategie più sostenibili per affrontare le sfide sanitarie della sclerosi multipla implicano investimenti a lungo termine nella ricerca, non solo economici, ma anche in nuovi modelli organizzativi che sappiano connettere la ricerca alla clinica e alla presa in carico, la sclerosi multipla ad altre malattie che condividano interessi di ricerca e di cura comuni.

Il portfolio di ricerca della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla è in prima fila nell'affrontare questa sfida.

Basta scorrere l'indice di questo Compendio: i progetti che presentiamo sono la rappresentazione plastica di una connessione strategica e preziosa tra tutte le aree della ricerca. Tra i progetti terminati, sei si sono occupati di neuro-riabilitazione e qualità della vita - area decisiva per una ricerca che già oggi impatti sulla vita delle persone - e ben 13 riguardano lo studio della patogenesi e dei fattori di rischio - perché è solo partendo da una ricerca di base eccellente che possiamo capire sempre meglio questa malattia e scoprire strade nuove per curarla.

Senza dimenticare i due progetti legati a nuovi contributi per la diagnosi e il monitoraggio della malattia e i sette che aprono i nostri percorsi di ricerca verso nuovi trattamenti.

Nella strada delle connessioni, vere e proprie "milestones" sono i progetti speciali che FISM sceglie di supportare: basti ricordare le reti di ricerca internazionali per lo studio sulle cellule staminali mesenchimali e neurali, la ricerca sulle forme progressive di SM, l'iniziativa internazionale sui Patient Reported Outcome (PRO-MS) insieme ai progetti che vogliono sviluppare una medicina personalizzata e i progetti di prevenzione che cercano di bloccare la strada allo sviluppo della SM. Ugualmente si rivelano sempre più feconde le connessioni che stiamo costruendo nel progetto Registro Italiano Sclerosi Multipla e nel Network Italiano di Neuro Imaging.

La scienza che sa unire i diversi attori coinvolti nell'affrontare diverse malattie è alla base di un nuovo modello di sostenibilità collettiva, un'alleanza trasversale per accelerare lo sviluppo di nuovi trattamenti e favorire la sostenibilità della ricerca.

In questo contesto strategico, il progetto MULTI-ACT, di cui FISM è il coordinatore, finanziato dalla Commissione Europea, rappresenta un'opportunità tempestiva e un riferimento importante per strutturare modelli di collaborazione stabile. Una ricerca e un'innovazione orientata alla missione non è più rimandabile e MULTI-ACT prova a fornire nuovi strumenti di governance e di rendicontazione per renderla operativa.

In questi modelli di collaborazione stabile, sempre più le persone che affrontano direttamente la malattia sono attori seduti allo stesso tavolo di tutti gli altri: per questo assumono oggi una rilevanza notevole le nuove Linee Guida internazionali che l'Associazione ha sviluppato all'interno dal progetto europeo MULTI-ACT, per il coinvolgimento delle persone con malattie neurologiche nella ricerca. Solo una scienza "con" e "della" persona potrà rendere percorribile una connessione piena tra ricerca e cura.

Mario Alberto Battaglia

Presidente FISM

Paola Zarin

Direttore Ricerca Scientifica FISM

We are all connected, each of us fragile yet heroic individuals, all of us with an undeniable bond with life. During these difficult times related to the Corona virus pandemic, one of the most undeniable lessons is this: cutting-edge research is something everyone deserves.

For those of us who are part of the multiple sclerosis world, where urgency is a mainstay, where we are called daily to carry out the highest quality of research, we have in our hands today and as an instrument for the future, a compass that must guide us in assuring that the decisive importance of research will never be left by the wayside.

At the same time that this introduction to the Compendium of 28 research projects and 21 special projects supported by FISM, is going to press, laboratories across Italy and abroad are severely obstructed due to the restrictions posed by the pandemic. Even so, research carries on, just as the disease does as well.

The connections that have been developed over many years are more solid and vital than ever.

It is no coincidence that the Italian Multiple Sclerosis Research Foundation Conference, entitled "Connecting MS", is an invitation to each of us to take an active part in influencing the impact of scientific research on people living with MS and on society in general.

The most effective strategies for facing healthcare issues related to multiple sclerosis call for a long-term investment in research, not only in economic terms, but also in the development of innovative organizational models that are capable of connecting clinical research with the everyday spectrum of care, as well as connecting multiple sclerosis with other diseases with similar research and care priorities.

The research portfolio of the Italian Multiple Sclerosis Research Foundation is a frontrunner in facing this challenge. It is clear simply by glancing at the index of this publication: the projects presented represent the foundations of strategic connections from every area of scientific research. Among the completed projects, six focus on neurorehabilitation and quality of life, decisive areas that have an impact on the lives of people living with MS today. Thirteen projects focus on disease pathogenesis and risk factors. Clearly basic research of excellence lays the foundation for a better understanding of the disease and the discovery of new therapies. Importantly, two projects have contributed to improving our understanding of diagnosis and disease monitoring and seven projects serve to open new channels of investigation into therapies.

Within the scope of creating connections, the true miles are the Special Projects chosen by FISM for support and include the international network for the study of mesenchymal and neural stem cells, concerted research on progressive forms of MS, international initiatives on Patient Reported Outcomes (PRO-MS), together with projects focused on personalized medicine and on disease prevention.

Science capable of unifying all stakeholders involved in facing different diseases is at the foundation of new models of collective sustainability, an alliance necessary for accelerating the development of new therapies and for guaranteeing the viability of research.

In this strategic context, the MULTI-ACT project, coordinated by FISM and financed by the European Commission, represents a timely opportunity, as well as an important example of the potential of models that promote enduring collaborations. Mission-oriented research and innovation must be the priority and MULTI-ACT is a concerted effort to provide new tools focused on governance and reporting necessary to make this goal operational.

Models of enduring collaboration require direct involvement of the very individuals who are living with an illness, participants in a dialogue with other stakeholders. For this reason, the new international guidelines developed within the European MULTI-ACT project, together the MS Society, take on particular significance. Clearly, only scientific research with and from individuals living with a disease can facilitate the connection between science and cure.

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

Abbracchio Maria Pia	138	Giovannetti Ambra Mara	116
Amato Maria Pia	127, 182, 209	Inglese Matilde	194, 200
Antonini Carla	113	Leocani Letizia	28
Ballerini Clara	45	Lorefice Lorena	172
Bandiera Paolo	106, 109	Manera Clementina	91
Barla Annalisa	17	Martino Gianvito	149
Baroncini Damiano	211	Matarese Giuseppe	157
Battaglia Mario Alberto	12, 180	Matteoli Michela	63
Bergamaschi Roberto	202	Messmer Ucelli Michele	122
Bertolotto Antonio	141	Mosconi Paola	178
Bonetti Bruno	94	Nobbio Lucilla	66
Brambilla Roberta	49	Pantano Patrizia	220
Brescia Morra Vincenzo	33	Paolicelli Damiano	184
Brichetto Giampaolo	120, 125	Patti Francesco	190, 198
Bruzzone Santina	97	Pedullà Ludovico	23
Centonze Diego	130	Pinti Marcello	69
Chieffo Raffaella	26	Priori Alberto	30
Cossarizza Andrea	39	Ristori Giovanni	160
Cucca Francesco	82, 146	Romeo Marzia	207
D'Amico Emanuele	192, 193	Ruggiero Giuseppina	66
De Stefano Nicola	218	Serafini Barbara	42
Deriu Franca	20	Solari Alessadra	135
Eberini Ivano	138	Sorosina Melissa	60
Esposito Federica Eva	166	Spadaro Michela	36
Fenu Giuseppe	174	Tedeschi Gioacchino	222
Ferraro Diana	196	Terreno Enzo	85
Filippi Massimo	214, 216	Trojano Maria	179, 186, 188, 204, 205
Frau Jessica	176	Tuosto Loretta	99
Gabrielli Martina	52	Ucelli Antonio	77, 152,
Galeotti Nicoletta	88	Ulivelli Monica	163
Gallo Vittorio	55	Vigo Tiziana	58

Indice / Index

INTRODUZIONE / INTRODUCTION

Mario A. Battaglia

Paola Zaratin

4

PROGETTI BANDO FISM TERMINATI NEL 2019

FISM CALL PROJECTS ENDED IN 2019

15

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

16

Annalisa Barla

Rilevamento precoce di progressione della sclerosi multipla basato su scale cliniche e misure autoriportate (DETECT-MS PRO)

Early DETECTION of Multiple Sclerosis progression driven by clinical scales and Patient Reported Outcome (DETECT-MS PRO)

17

Franca Deriu

Efficacia dell'allenamento controlaterale nella gestione della debolezza muscolare e della fatica in persone con sclerosi multipla

Effectiveness of contralateral training in the management of muscle weakness and fatigue in individuals with multiple sclerosis

20

Ludovico Pedullà

Studio dei correlati comportamentali e neurali in compiti di dual task in ambiente ecologico: indagine fNIRS prima e dopo un intervento riabilitativo in persone con sclerosi multipla

Behavioural and neural correlates of dual tasks negotiation in ecological setting: an fNIRS study to investigate cognitive-motor interference after rehabilitation in people with multiple sclerosis

23

Raffaella Chieffo

Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva con Hcoil per potenziare gli effetti della riabilitazione cognitiva nelle persone con sclerosi multipla progressiva

Repetitive transcranial magnetic stimulation with the H-coil to enhance the effects of cognitive rehabilitation in people with progressive multiple sclerosis

26

Letizia Leocani

Effetti della rTMS con H-Coil sulla capacità deambulatoria nella sclerosi multipla: studio di fase III controllato, randomizzato doppio cieco

Effect of rTMS with H-coil for lower limb disturbances associated with walking disability in MS: a controlled, randomized, double blind Phase III study

28

Alberto Priori

La stimolazione spinale transcutanea a corrente continua e la stimolazione transcranica a corrente continua come strumenti per migliorare la spasticità nella sclerosi multipla

Transcutaneous spinal cord and transcranial direct current stimulation as tools to improve spasticity in multiple sclerosis

30

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

32

Vincenzo Brescia Morra

Studio di un nuovo meccanismo di innesco della sclerosi multipla mediato dal batterio non-typeable Haemophilus influenzae

Understanding a new trigger mechanism in multiple sclerosis mediated by the non-typeable Haemophilus Influenzae bacterium

33

Michela Spadaro	36
La gravidanza: un potente fenomeno transitorio di immunosoppressione nelle donne con sclerosi multipla Pregnancy: a powerful transient immunosuppressive phenomenon in multiple sclerosis women	
Andrea Cossarizza	39
DAMPs mitocondriali nella sclerosi multipla: uno studio pilota Mitochondrial DAMPs in multiple sclerosis: a pilot study	
Barbara Serafini	42
Studio dei meccanismi immunopatologici in tessuto cerebrale donato da persone con sclerosi multipla: focus su linfociti T citotossici EBV-specifici, cellule NK e risposta all'IFN-gamma Study of immunopathological mechanisms in the multiple sclerosis brain: focus on Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes, NK cells and response to IFN-gamma	
Clara Ballerini	45
Valutazione dell'impatto delle terapie immunomodulatorie su pazienti SMRR tramite lo studio del repertorio TCR con tecniche di next generation sequencing Impact of successful immunomodulatory treatments in RRMS on human TCR repertoire by next generation sequencing	
Roberta Brambilla	49
Meccanismi molecolari della funzione protettiva del TNFR2 oligodendrogliale: un nuovo target terapeutico nelle patologie neuroimmuni Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuro-immune disease	
Martina Gabrielli	52
Possibili effetti divergenti di microglia e macrofagi sui precursori degli oligodendrociti: ruolo delle vescicole extracellulari Microglia versus macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles	
Vittorio Gallo	55
Meccanismi di segnalazione mediati da Sox17 implicati in genesi e rigenerazione di oligodendrociti Signaling mechanisms underlying Sox17-mediated oligodendrocyte generation and repair	
Tiziana Vigo	58
Identificazione di un circuito neurale che controlla il rilascio dal midollo osseo di cellule immunitarie rilevanti per l'induzione dell'encefalite autoimmune sperimentale Identification of a neural circuit controlling the mobilization from the bone marrow of immune cells relevant for experimental autoimmune encephalomyelitis induction	
Melissa Sorosina	60
Coinvolgimento della proteina NINJ2 nell'attività di malattia della sclerosi multipla Involvement of NINJ2 protein in multiple sclerosis disease activity	
Michela Matteoli	63
Un modello umanizzato di barriera ematoencefalica per investigare l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nella sclerosi multipla: verso un approccio di medicina personalizzata A humanized model of blood brain barrier to investigate immune cells infiltration in multiple sclerosis: toward a personalized medicine approach	
Giuseppina Ruggiero	66
CuZn Superossido dismutasi (SOD-1), specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), attivazione linfocitaria T e controllo della tolleranza immunitaria nella sclerosi multipla CuZn Superoxide dismutase (SOD-1), intracellular Reactive Oxygen Species (ROS), T cell activation and immune tolerance control in multiple sclerosis	

Marcello Pinti	69
Regolazione del metabolismo cellulare nei linfociti di pazienti con forme progressive di sclerosi multipla Regulation of cell metabolism in lymphocytes from patients with progressive forms of multiple sclerosis	
DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE	72
Antonio Uccelli	77
Targeting terapeutico dell'attività e dell'espressione di REST allo scopo di ridurre la neurodegenerazione e i deficit sinaptici in modelli di EAE cronica Therapeutic targeting of REST activity and expression to reduce neurodegeneration and synaptic deficits in chronic EAE	
Lucilla Nobbio	66
Marcatori biologici per monitorare demielinizzazione e rimielinizzazione Biomarkers to monitor demyelination and remyelination	
VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS	81
Francesco Cucca	82
Elucidazione del ruolo di BAFF e della sua via immuno-patogenetica nell'insorgenza della sclerosi multipla e utilizzo dell'avanzamento in conoscenza per lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci Dissection of the BAFF pathway in multiple sclerosis with a view toward more specific and effective therapies	
Enzo Terreno	85
Visualizzazione simultanea di linfociti T e B mediante in vivo MRI in un modello murino di sclerosi multipla: implicazioni nella patogenesi e nel trattamento terapeutico In vivo dual MRI detection of T and B lymphocytes in a MS mouse model: implications in the pathogenesis and therapeutic treatment	
Nicoletta Galeotti	88
Aggredire il dolore neuropatico e il danno assonale nella sclerosi multipla tramite una modulazione genetica delle proteine ELAV Targeting neuropathic pain and axonal damage in multiple sclerosis through genetic modulation of ELAV RNA binding proteins	
Clementina Manera	91
Modulazione multi-target del sistema endocannabinoide come innovativo approccio terapeutico per la sclerosi multipla Multi-target modulation of the endocannabinoid system as an innovative therapeutic approach for multiple sclerosis	
Bruno Bonetti	94
Homing e target cellulari di esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali adipose nell'encefalomielite autoimmune sperimentale Homing and cell targets of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis	
Santina Bruzzone	97
L'inibizione di SIRT6 come un approccio terapeutico nel trattamento della sclerosi multipla SIRT6 inhibition as a therapeutic approach for treating multiple sclerosis	
Loretta Tuosto	99
Ruolo del CD28 e della PI3K di classe 1A nella regolazione dei processi metabolici associati alle risposte pro-infiammatorie dei linfociti T nella sclerosi multipla Role of CD28 and associated class 1A PI3K in the regulation of the cellular metabolic programs associated to pro-inflammatory T cell responses in MS	

PROGETTI SPECIALI / SPECIAL PROJECTS **103**

Introduzione / Introduction **104**

ADVOCACY / ADVOCACY **105**

Paolo Bandiera **106**

Ricognizione dell'offerta riabilitativa per la sclerosi multipla nei diversi contesti regionali
Review of rehabilitative provision for multiple sclerosis in different regional contexts in Italy

Paolo Bandiera **109**

Valutazione comparativa dei PDTA regionali per la sclerosi multipla e proposta di PDTA nazionale di riferimento
Comparative evaluation of regional PDTAs for multiple sclerosis and proposal for a national PDTA

MEDICINA PERSONALIZZATA / PERSONALIZED MEDICINE **112**

Carla Antonini **113**

Accountability e approccio multi-stakeholder per misurare l'impatto della ricerca
Accountability and multiple-constituency approach to measure impact of research

Ambra Mara Giovannetti **116**

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 Brichetto **120**

Un nuovo profilo funzionale per monitorare la progressione della disabilità nella sclerosi multipla
A new functional profile to monitor the progression of disability in MS (PROMOPRO-MS)

Michele Messmer Ucelli **122**

Quali fattori influenzano la percezione di competenza del genitore con sclerosi multipla?
What factors influence feeling competent as a parent with multiple sclerosis?

Giampaolo Brichetto **125**

Mapping MS: applicazione mobile per il monitoraggio delle emozioni motorie-cognitive nella sclerosi multipla
Mapping MS: Mobile Application for monitoring of motor-cognition-emotion in multiple sclerosis

Maria Pia Amato **127**

Riabilitazione cognitiva dell'attenzione, a domicilio con l'uso del computer, in soggetti con sclerosi multipla a esordio pediatrico: uno studio pilota multicentrico
Home-based, computer-assisted, cognitive rehabilitation for attention in pediatric onset multiple sclerosis using a new dedicated software: a pilot multicenter study

Diego Centonze **130**

La sinaptopatía 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

SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS **134**

Alessandra Solari **135**

Linee guida EAN sulle cure palliative per le persone con sclerosi multipla grave
EAN guideline on palliative care of people with severe multiple sclerosis

Maria Pia Abbraccio/Ivano Eberini **138**

Sviluppo di un brevetto su nuovi modulatori di GPR17, un recettore coinvolto nei processi di rimielinizzazione
Patent development of new modulators of GPR17, a key receptor in remyelinating processes

Antonio Bertolotto	141
Una biobanca ed un laboratorio dedicati alla raccolta ed alla distribuzione di campioni biologici di SMPP, la replicazione e la condivisione di dati e la validazione di metodi biologici	
A bio-bank and a laboratory devoted to the collection and supply of biological samples of PPMS, the replication and sharing of data, and the validation of biological methods	
VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS	145
Francesco Cucca	146
Elucidazione del ruolo di BAFF e della sua via immuno-patogenetica nell'insorgenza della sclerosi multipla e utilizzo dell'avanzamento in conoscenza per lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci	
Dissection of the BAFF pathway in multiple sclerosis with a view toward more specific and effective therapies	
Gianvito Martino	149
Trapianto di cellule staminali neurali in pazienti con SM: uno studio di fase I	
Neural stem cells transplantation in MS patients: a Phase I study	
Antonio Uccelli	152
Cellule Staminali Mesenchimali per la Sclerosi Multipla (MESEMS)	
MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS)	
Giuseppe Matarese	157
Restrizione calorica come nuovo approccio terapeutico per manipolare l'immunità e per migliorare il potenziale terapeutico di farmaci di prima linea nella SM recidivante remittente	
Caloric restriction as a novel therapeutic tool to manipulate immunity and improve therapeutic potential of first line drug treatments during relapsing remitting MS	
Giovanni Ristori	160
Il vaccino Bacille Calmette-Guérin nella sindrome radiologicamente isolata	
Bacille Calmette-Guérin vaccine in radiologically isolated syndrome	
Monica Ulivelli	163
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	166
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	
REGISTRO ITALIANO SCEROSI MULTIPLA	169
MULTIPLE SCLEROSIS ITALIAN REGISTER	
Introduzione / Introduction	170
EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA / DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY	172
Lorena Lorefice	172
Caratterizzazione clinica ed evoluzione della sclerosi multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo	
Clinical characteristics and disease outcomes of late onset multiple sclerosis: a retrospective multicenter study	

Giuseppe Fenu	174
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	176
Valutazione dei fattori prognostici al basale in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla	
Evaluation of baseline prognostic factors in a large Italian cohort of patients with multiple sclerosis	
Paola Mosconi on behalf of Scientific Committee	178
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	
Maria Trojano	179
Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano Sclerosi Multipla sulle forme secondariamente progressive	
INTEREST: Italian Multiple Sclerosis Registry non interventional retrospective analysis in secondary progressive multiple sclerosis	
Mario Alberto Battaglia on behalf of Scientific Committee	180
Validazione di un metodo per l'identificazione di casi prevalenti e incidenti di SM utilizzando differenti sorgenti di dati. Un case study in alcune province 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	
OTTIMIZZAZIONE DELLE TERAPIE / THERAPY OPTIMIZATION	182
Analisi delle terapie / Therapy analysis	182
Maria Pia Amato	182
Valutare l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti nella sclerosi multipla progressiva	
Assessing efficacy and safety of treatments in progressive multiple sclerosis	
Damiano Paolicelli	184
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 multiple sclerosis. Italian iMedWeb MS Registry. RE.LO.DI.MS Study	
Maria Trojano	186
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	188
Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network	
Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network	
Francesco Patti	190
Studio pilota retrospettivo sugli effetti a lungo termine di Cladribina in pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente o sindrome clinicamente isolata	
Retrospective pilot study on long-term Cladribine effects in patients with relapsing remitting multiple sclerosis or clinically isolated syndrome	

Emanuele D'Amico	192
Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico	
Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study	
Emanuele D'Amico	193
Il fenotipo e il recupero delle ricadute nei pazienti con sclerosi multipla recidivante remittente: vecchie e nuove terapie modificanti il decorso a confronto	
Exploring phenotype and recovery from relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis patients: old versus new disease-modifying therapies	
Matilde Inglese	194
Trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento della sclerosi multipla secondariamente progressiva: studio comparativo con pazienti del Registro Italiano Sclerosi Multipla	
Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for secondary progressive multiple sclerosis: a comparative study with matched control patients from the Italian Multiple Sclerosis Register	
Diana Ferraro	196
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	
Progetti specifici / Specific Project	198
Francesco Patti	198
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	
Matilde Inglese	200
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 Multiple Sclerosis Registry	
Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta alla terapia / Prognostic factors and predictive models of response to therapy	202
Roberto Bergamaschi	202
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	
Maria Trojano	204
Analisi del Registro Italiano di Sclerosi Multipla per studiare il concetto di progressione indipendente dalle ricadute	
INSPIRA - Italian analysis of the National multiple sclerosis registry Studying the concept of Progression Independent from Relapse Activity	
Maria Trojano	205
Confronto tra due diversi algoritmi di trattamento nella sclerosi multipla recidivante: approccio aggressivo sin dall'esordio in confronto al classico schema sequenziale	
Early-aggressive treatment algorithm versus classical escalation therapy in relapsing multiple sclerosis	
Marzia Romeo	207
Fattori predittivi di progressione di disabilità in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla	
Predictive factors of disability progression in a large cohort of Italian multiple sclerosis patients	

FORME RARE DI SM / RARE FORMS OF MS **209**

Maria Pia Amato **209**

E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort

E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort

Damiano Baroncini **211**

Valutare il decorso clinico della sclerosi multipla a esordio pediatrico in ere differenti di trattamento: stiamo davvero modificando la malattia?

Assessing the clinical course of pediatric onset multiple sclerosis in different treatment eras: are we really modifying the disease?

NETWORK ITALIANO DI NEUROIMAGING (INNI) **213** **THE ITALIAN NEUROIMAGING NETWORK INITIATIVE (INNI)**

Massimo Filippi **214**

Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM

The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to optimize the use of advanced MRI techniques in patients with MS

Massimo Filippi **216**

Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica

Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice

Nicola De Stefano **218**

Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con SM

Large-scale, multi-centre assessment of hippocampal volume in MS patients

Patrizia Pantano **220**

L'impatto dei cambiamenti della connettività funzionale sulla progressione della malattia e l'accumulo di disabilità

The impact of functional connectivity changes on disease progression and disability accumulation

Gioacchino Tedeschi **222**

Determinanti RM strutturali e funzionali di disequilibrio cognitivo-radiologico in pazienti con SM

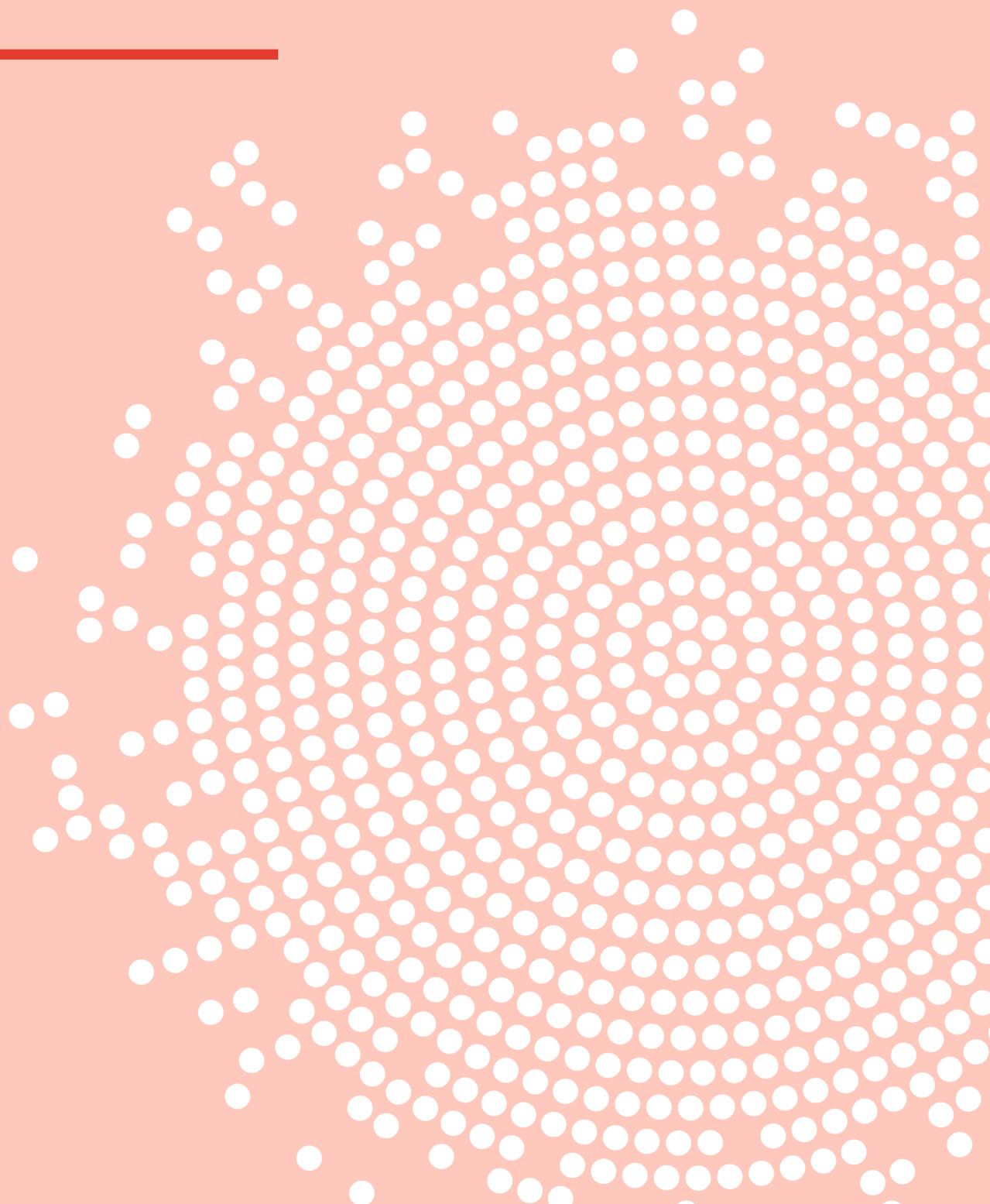
Structural and functional MRI determinants of cognitive-radiological mismatch in MS patients

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM **225** **FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2019, 2018**

COMITATO SCIENTIFICO FISM **236** **FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2019, 2018**

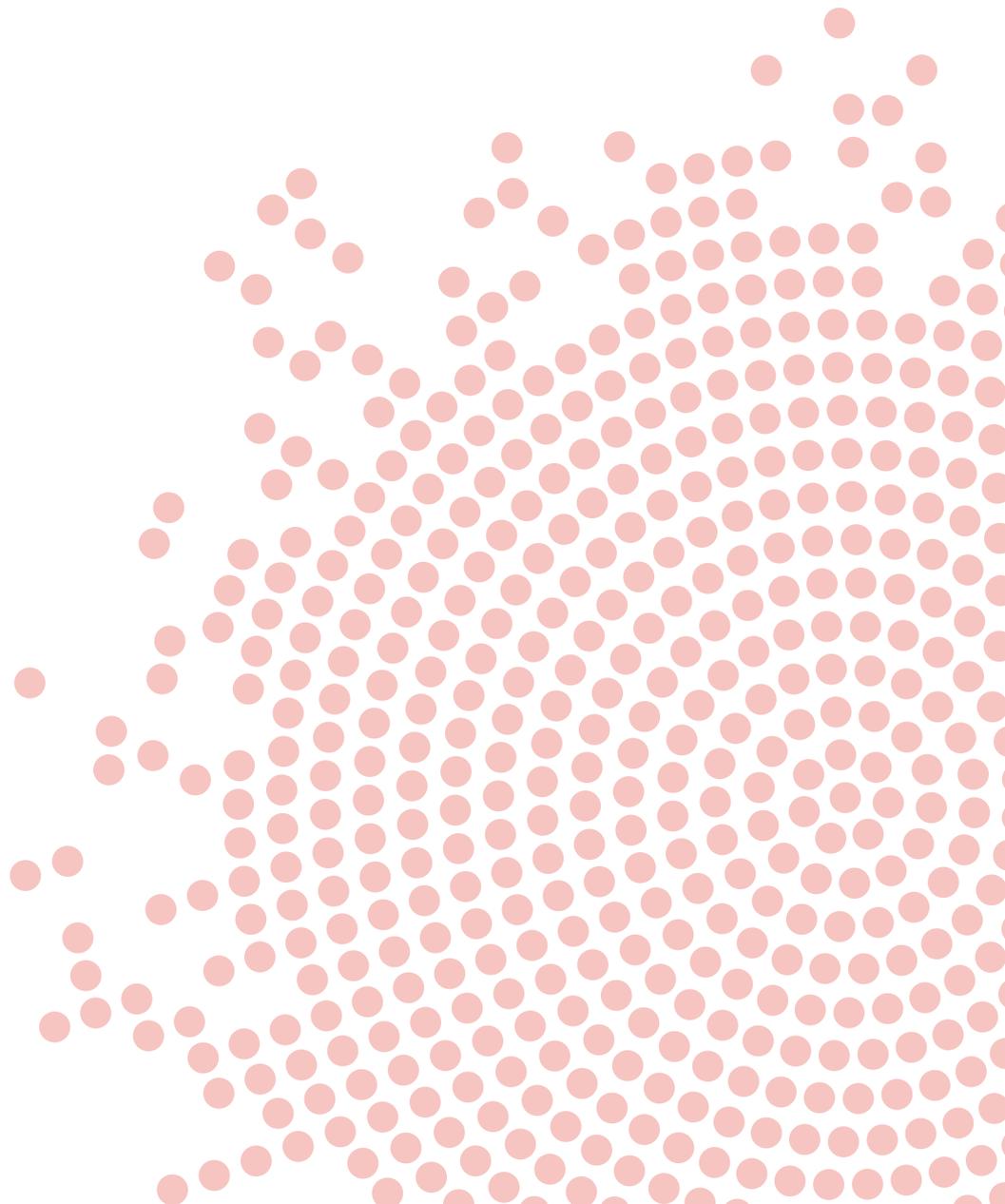
PROGETTI BANDO FISM TERMINATI NEL 2019

FISM CALL PROJECTS
ENDED IN 2019



Neuroriabilitazione e qualità della vita

Neurorehabilitation
and quality of life



Rilevamento precoce di progressione della sclerosi multipla basato su scale cliniche e misure autoriportate (DETECT-MS PRO)



Annalisa Barla

Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria de Sistemi, DIBRIS, Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI/COLLABORATORS
Samuele Fiorini, Alessandro Verri

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHERS GROUPS
Giampaolo Brichetto, Andrea Tacchino, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è principalmente classificata in tre corsi di malattia: recidivante remittente (RR), caratterizzata da attacchi chiaramente definiti di peggioramento della funzione neurologica seguiti da periodi di recupero parziale o completo; secondariamente progressiva (SP), che segue il decorso della RR ed è caratterizzata da un progresso più costante; primariamente progressiva (PP), caratterizzata da un costante peggioramento della funzione neurologica fin dall'inizio. In particolare, l'identificazione del punto di transizione quando la RR si converte in SP è estremamente impegnativa, anche se cruciale per migliorare le opzioni terapeutiche decisionali e di impatto sulle strategie farmacologiche e riabilitative.

Il progetto proposto si basa su un set di dati che presenta misure come le scale cliniche (CS) e gli esiti riportati dai pazienti (PRO). Il progetto mira a sviluppare un nuovo modello affidabile e non invasivo, basato sui dati longitudinali delle scale cliniche e sugli esiti riportati dai pazienti, in grado di prevedere la transizione del decorso della malattia dalla RR alla SP. Questo nuovo approccio potrebbe ridurre l'uso di valutazioni strumentali (es. RM), solitamente stressanti per i pazienti, portando a una gestione meno invasiva della malattia.

RISULTATI

Durante il primo anno di questo progetto, abbiamo sviluppato un nuovo modello temporale basato su esiti centrati sul paziente (PCO) e sull'apprendimento auto-

matico per la previsione della forma della malattia nella sclerosi multipla.

In particolare, abbiamo affrontato i compiti dell'attuale assegnazione dei corsi, la previsione dell'evoluzione dei PCO e l'assegnazione dei corsi futuri. Il modello è costruito su una collezione di PCOs acquisite su una coorte di individui iscritti a uno studio finanziato in corso (DETECT-MS PRO). I dati dei PCOs sono tipicamente utilizzati per corroborare le prove fornite dagli esami quantitativi, nel nostro caso l'assenza di chiari predittori della forma della malattia di SM rende le informazioni estratte dai dati dei PCOs l'unica risorsa disponibile.

Il modello temporale proposto è stato in grado di assegnare correttamente l'attuale forma di SM e di prevedere quelle future con un'accuratezza del 90,0% e dell'84,1%, rispettivamente. Ciò dimostra che i PCO possono essere efficacemente utilizzati come predittore del decorso della malattia di SM. Nell'era della medicina di precisione, il problema di prevedere l'evoluzione del decorso della SM si basa ancora su esami stressanti e sul giudizio clinico.

Per quanto ne sappiamo, questo è il primo tentativo di risolvere questo delicato compito facendo leva su misure a misura del paziente e sull'apprendimento automatico.

Dopo il primo anno, abbiamo dedicato il nostro tempo ad estendere il modello predittivo ai dati appena acquisiti, verificandone le prestazioni predittive. Il set di dati copre ora più di 800 pazienti e quindi è un'opportunità unica per comprendere l'evoluzione della SM.

Una parte di questo tempo è stata investita nello studio e nella comprensione di nuove tecniche di machine learning.

CONCLUSIONI

La parte finale di questo progetto è stata investita nello studio e nella comprensione di nuove tecniche di machine learning che possono essere importate in questo contesto

da altre applicazioni biomediche, come lo studio di serie temporali che descrivono le prescrizioni mediche e l'assicurazione dei pazienti. Tali tecniche si basano su metodi di apprendimento profondo e saranno fondamentali se la quantità di dati disponibili sarà ancora più grande di adesso. Inoltre, queste tecniche sono abbastanza flessibili da tollerare i valori mancanti.

Early DETECTION of Multiple Sclerosis progression driven by clinical scales and Patient Reported Outcome (DETECT-MS PRO)

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 more steadily 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.

The project aims to develop a new, reliable and non-invasive model, based on longitudinal data from clinical scales and patient reported outcomes, able to predict disease course transition from RR to SP. This new approach could reduce the use of instrumental evaluations (i.e. MRI), usually stressful for patients, leading to a less invasive management of the disease.

RESULTS

During the first year of this project, we developed a novel temporal model based on patient-centered outcomes (PCOs) and machine learning for disease form prediction in multiple sclerosis. In particular, we addressed the tasks of current course assignment, PCOs evolution prediction and future course assignment. The model is built on a collection of PCOs acquired on a cohort of individuals enrolled in an ongoing funded study (DETECT-MS PRO). PCOs

data are typically used to corroborate evidence provided by quantitative exams, in our case the absence of clear MS disease form predictors makes the information extracted from PCOs data the only available resource. The proposed temporal model was able to correctly assign the current MS form and to foresee future ones with accuracy of 90.0% and 84.1%, respectively. This demonstrates that PCOs can effectively be used as MS disease course predictor.

In the era of precision medicine, the problem of predicting MS course evolution still relies on stressful exams and clinical judgement. To the best of our knowledge, this is the first attempt to solve this delicate task leveraging on patient-friendly measures and machine learning.

After the first year, we dedicated our time to extend the predictive model to the newly acquired data, verifying its predictive performance. The dataset covers now more than 800 patients and therefore it is a unique opportunity for understanding the evolution of MS.

CONCLUSIONS

The final part of this project was invested in studying and understanding new machine learning techniques that may be imported in this context from other biomedical applications, such as the study of time-series describing the medical prescriptions and insurance of patients. Such techniques are based on deep-learning methods and will be fundamental if the amount of available data will be even larger than now. Also, these techniques are flexible enough to tolerate missing values.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Brichetto G, Monti Bragadin M, Fiorini S, Bataglia 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
- Fiorini S, Hajati F, Barla A, Girosi F. Predicting diabetes second-line therapy initiation in the Australian population via time span-guided neural attention network. *PLoS One.* 2019 Oct 18;14(10): e0211844. doi: 10.1371/journal.pone.0211844
- Oral presentations - Fiorini S. Data Science Strategies for Clinical Management of Multiple Sclerosis. 2019 INFORMS International Conference - Cancun, Mexico <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/6824/session/69>

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 110.000 €
Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years and the amount of € 110,000

Efficacia dell'allenamento controlaterale nella gestione della debolezza muscolare e della fatica in persone con sclerosi multipla



Franca Deriu

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Guido Bua, Enzo Ortu, Edoardo Rosario de Natale, Elena Aiello, Andrea Manca

Daniele Dragone, Giovanni Mureddu, Francesca Ginatempo, Beniamina Mercante

PREMESSE E OBIETTIVI

Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che le persone affette da sclerosi multipla (PcSM) presentano spesso una significativa asimmetria di forza agli arti inferiori, più frequentemente a livello della caviglia. Le differenze tra gli arti dovrebbero essere tenute in considerazione quando si definiscono i protocolli riabilitativi. Infatti, l'arto più colpito potrebbe non essere sempre allenato in modo efficiente perché spesso risulta troppo compromesso per sostenere qualsiasi programma di esercizio. Per questi soggetti, un allenamento di forza controlaterale (CST) del lato sano o meno colpito può indurre guadagni indiretti di forza e funzione nell'arto più colpito. Il CST si riferisce a un fenomeno interemisferico in cui l'esercizio su un arto può aumentare la forza nel lato non allenato.

Con questo progetto abbiamo pianificato di testare, in PcSM con marcata debolezza unilaterale dei muscoli dorsiflessori della caviglia, gli effetti del CST, e di confrontarlo con il convenzionale allenamento diretto (DST) sulle seguenti variabili: (1) forza massima dei dorsiflessori della caviglia, (2) adattamenti neurali associati ai guadagni di forza osservati e (3) mobilità funzionale e velocità del cammino. Queste variabili sono state valutate prima e dopo un allenamento isocinetico/concentrico unilaterale di 6 settimane (3 sedute/settimana) dell'arto meno colpito (gruppo CST) e dell'arto più colpito (DST).

RISULTATI

Cinquanta persone con SM con forma recidivante-remitte (40F:10M; età 49.1 ± 15.4 anni; peso 61.6 ± 16 kg; durata di malattia 164 ± 101 mesi), disabilità da lieve a moderata (EDSS mediana=4) e asimmetria di forza dei dorsiflessori della caviglia (punteggio > 1 alla scala del Medical Research Council Scale) sono state assegnate in modo ca-

suale a un gruppo di rinforzo controlaterale (CST: n=24) o diretto (DST: n=26) e hanno completato un allenamento di forza di 6 settimane di massima intensità dei dorsiflessori meno o più colpiti, rispettivamente.

Al PRE, i livelli di forza erano comparabili nei due gruppi. Al termine dell'intervento, l'arto più debole di entrambi i gruppi ha mostrato aumenti significativi della forza isocinetica massima, con guadagni significativamente maggiori dopo CST (+36.1%) rispetto al DST (+15%).

La performance ai test di mobilità (test dei 10 metri di cammino cronometrato; test di camminata di 2 minuti) è risultata migliorata dopo entrambi gli interventi, senza alcuna superiorità di un approccio rispetto all'altro. La velocità del cammino è aumentata in entrambi i gruppi (CST: +11.3%; DST: +14.6%), con guadagni significativamente maggiori dopo DST.

Per quanto riguarda gli adattamenti neurali, questi sono stati osservati solo dopo CST in termini di diminuzione dell'attività dei circuiti inibitori dell'emisfero cerebrale relativo all'arto non allenato, come dimostrato da una ridotta inibizione intracorticale a breve latenza (-33.7%) e dalla ridotta durata del periodo silente corticale (-49.3%). Inoltre, l'attività elettromiografica dei muscoli dorsiflessori della caviglia più deboli e non allenati è aumentata dopo l'allenamento solo nel gruppo CST (+25.4%).

CONCLUSIONI

In conclusione, dopo 6 settimane di allenamento di rinforzo muscolare, il CST si è dimostrato più efficace del DST nell'indurre aumenti di forza e adattamenti neurali, mentre il DST ha portato a maggiori cambiamenti nella velocità del cammino, che è considerata la variabile funzionale più rilevante nelle popolazioni neurologiche. Pertanto, questi risultati supportano il DST come prima opzione di tratta-

mento, quando possibile. Tuttavia, quando un arto è troppo compromesso per sostenere un allenamento diretto, il CST può rappresentare una promettente strategia alternativa, a integrazione dei protocolli di rinforzo muscolare più convenzionali impiegati nella riabilitazione della SM. I risultati generati dal presente progetto possono essere di

immediata rilevanza e applicazione pratica nel campo della SM, considerando che la debolezza muscolare è uno dei sintomi cardinali della malattia e che si presenta per lo più in modo unilaterale, contribuendo così a compromettere l'andatura e ad aumentare il rischio di cadute.

Effectiveness of contralateral training in the management of muscle weakness and fatigue in individuals with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Clinical and experimental studies evidence that people with multiple sclerosis (PwMS) often exhibit a significant leg asymmetry in strength, most frequently at the ankle site. Inter-limb differences should be then considered when designing protocols in PwMS with asymmetry in strength and function. Indeed, the most affected limb might not always be efficiently trained because it is frequently too compromised to sustain any exercise program. For these subjects, a contralateral strength training (CST) of the sound or less-affected side may induce indirect gains of strength and function in the most affected limb. CST refers to an interlimb phenomenon whereby exercise on one limb can increase strength in the untrained side.

By this project we planned to test, in PwMS exhibiting marked unilateral weakness of the ankle dorsiflexion muscles, the effects of CST, and compare it to the conventionally employed direct strength training (DST) on the following outcomes: (1) ankle dorsiflexors' maximal strength, (2) neural adaptations associated to the observed strength gains, and (3) functional mobility and walking speed. Outcome assessment was performed before and after a 6-week unilateral isokinetic/concentric training (3 times/week) of the less-affected and more-affected limbs, respectively.

RESULTS

Fifty PwMS with relapsing-remitting course (40F:10M; age 49.1 ± 15.4 ; weight 61.6 ± 16 kg; illness duration 164 ± 101 months), mild-to-moderate disability (median EDSS=4), and ankle dorsiflexors' strength asymmetry (score > 1 at the Medical Research Council Scale) were randomly assigned to a contralateral (CST: $n=24$) or direct training (DST: $n=26$) group, and completed a 6-week maximal-intensity strength training of the less- or more-affected dorsiflexors, respectively.

At baseline, strength levels were comparable in CST and

DST groups. Following the intervention period, the weaker limb of both groups showed significant increases in maximal isokinetic strength, with significantly larger gains after CST (+36.1%) than DST (+15%).

The performance during mobility outcomes (10-meter timed walk; 2-minute walking test) was found improved following both interventions, with no superiority of one approach over the other. Walking speed was found increased in both groups (CST: +11.3%; DST: +14.6%), with significantly larger gains after DST. Neural adaptations were observed only after CST in terms of decreased activity of inhibitory circuits within the unexercised cerebral hemisphere as shown by a significantly reduced short-latency intracortical inhibition (-33.7%) and duration of the cortical silent period (-49.3%). In addition, electromyographic activity from the weaker, untrained ankle dorsiflexion muscles increased only after CST (+25.4%).

CONCLUSIONS

In conclusion, after 6 weeks of strength training, CST proved more effective than DST in inducing strength gains and neural adaptations, whereas DST led to larger changes in walking speed, which is considered as the most relevant functional outcome measure in frail populations. Therefore, these findings indicate DST as the first option, when viable. However, when a limb is too compromised to sustain a direct training, CST can be viewed as a promising strategy, complementing more conventional resistance protocols employed in MS rehabilitation.

The findings generated by the present project may be of prompt relevance and practical application to the MS realm considering that muscle weakness is among the cardinal symptoms of the disease, and that it mostly presents unilaterally, thus contributing to impair gait and escalate the risk of falls.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Manca A, Martinez G, Cereatti A, Della Crocer U, Venturi L, Dvir Z, Deriu, F. Isokinetic predictors of gait speed increase following high-intensity resistance training of the ankle dorsiflexors in people with multiple sclerosis: A pilot study. *Clinical Biomechanics* 2019, 67, 102-106. doi:10.1016/j.clinbiomech.2019.05.008
- Manca A, & Deriu, F. Perspectives on neuro-rehabilitation of unilateral impairments through cross-education. *Disability and Rehabilitation* 2019, 41(25),3090-3091. doi:10.1080/09638288.2019.1635656
- Manca A, Dvi Z, & Deriu F. Meta-analytic and scoping study on strength training in people with multiple sclerosis. *Journal of Strength and Conditioning Research* 2019, 33(3), 874-889. doi:10.1519/jsc.0000000000002381
- Manca A, Hortobágyi T, Rothwell J, Deriu, F. Neurophysiological adaptations in the untrained side in conjunction with cross-education of muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Physiology* 2018, 124(6), 1502-1518. doi:10.1152/jappphysiol.01016.2017
- Manca A, Dvir Z, Deriu, F. (2018). Strength and work parameters in people with multiple sclerosis and in healthy individuals: A responsiveness study of the ankle dorsiflexors. *Isokinetics and Exercise Science*, 26(1), 53-61. doi:10.3233/IES-171204
- Manca, A, Cabboi MP, Dragone D, Ginatempo F, Ortu E, De Natale, ER, . . . Deriu F. Resistance training for muscle weakness in multiple sclerosis: Direct versus contralateral approach in individuals with ankle dorsiflexors' disparity in strength. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2017, 98(7), 1348-1356.e1. doi:10.1016/j.apmr.2017.02.019
- Manca A, Dragone D, Dvir Z, Deriu F. Cross-education of muscular strength following unilateral resistance training: A meta-analysis. *European Journal of Applied Physiology* 2017, 117(11), 2335-2354. doi:10.1007/s00421-017-3720-z
- Manca A, Dvir Z, Dragone D, Mureddu G, Bua G, Deriu F. Time course of strength adaptations following high-intensity resistance training in individuals with multiple sclerosis. *European Journal of Applied Physiology* 2017, 117(4), 731-743. doi:10.1007/s00421-017-3534-z
- Manca A, Cabboi MP, Ortu E, Ginatempo F, Dragone D, Zarbo IR, . . . Deriu F. Effect of contralateral strength training on muscle weakness in people with multiple sclerosis: Proof-of-concept case series. *Physical Therapy* 2016, 96(6), 828-838. doi:10.2522/ptj.20150299
- Manca A, Ginatempo F, Cabboi, MP, Mercante B, Ortu E, Dragone D, . . . Deriu F. (2016). No evidence of neural adaptations following chronic unilateral isometric training of the intrinsic muscles of the hand: A randomized controlled study. *European Journal of Applied Physiology*, 116(10), 1993-2005. doi:10.1007/s00421-016-3451-6
- Manca A, Pisanu F, Ortu E, De Natale ER, Ginatempo F, Dragone D, . . . Deriu F. (2015). A comprehensive assessment of the cross-training effect in ankle dorsiflexors of healthy subjects: A randomized controlled study. *Gait and Posture*, 42(1), 1-6. doi:10.1016/j.gaitpost.2015.04.005
- Manca A, Solinas G, Dragone D, Dvir Z, Deriu F. Characterization of ankle dorsiflexors performance in healthy subjects following maximal-intensity isokinetic resistance training. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2015, 25(5), 773-781. doi:10.1016/j.jelekin.2015.06.002

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

Studio dei correlati comportamentali e neurali in compiti di dual task in ambiente ecologico: indagine fNIRS prima e dopo un intervento riabilitativo in persone con sclerosi multipla



Ludovico Pedullà

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova, Genova

MENTORE

Marco Bove

PREMESSE E OBIETTIVI

Le attività della vita quotidiana richiedono frequentemente di svolgere contemporaneamente compiti motori e cognitivi (dual tasks, DT). Questo può portare a un aumento di richiesta di risorse neurali e all'insorgenza di meccanismi di interferenza cognitivo-motoria. Nelle persone con sclerosi multipla (SM), questo può essere causa di rischio cadute durante la deambulazione. È oggi possibile studiare le attivazioni neurali in ambiente ecologico utilizzando la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS), una tecnica di imaging che misura le modifiche di concentrazione dell'emoglobina ossigenata e deossigenata.

Gli obiettivi di questo progetto erano identificare i DT che impattano maggiormente le attività quotidiane nella SM; studiare le strategie di interazione cognitivo-motoria e le attivazioni corticali coinvolte nell'esecuzione di DT in ambiente ecologico in soggetti sani e persone con SM; valutare i processi neurali alla base del recupero funzionale guidato dalla riabilitazione in persone con SM.

RISULTATI

È stato sviluppato un nuovo questionario, chiamato DI-DA-Q, che include 20 attività della vita quotidiana riguardo a compiti motori e cognitivi. Ai partecipanti (N=215 persone con SM; 155 femmine; età=49.8±12.8; EDSS=4.1±1.6) è stato chiesto di valutare il livello di difficoltà percepito quando devono effettuare due di questi compiti simultaneamente.

L'Analisi Fattoriale Esplorativa ha mostrato che un modello basato su 19 item (uno è stato eliminato a causa di un basso coefficiente di saturazione) produce una soluzione a tre fattori, che rappresenta complessivamente il 69,5% della varianza totale. I tre fattori riguardano equilibrio e

mobilità (sei item), funzioni cognitive (otto item) e abilità degli arti superiori (cinque oggetti).

Questi risultati ci hanno permesso di rilevare i DT percepiti come più difficili da eseguire dalle persone con SM nella vita reale. Sono stati identificati i seguenti compiti: tra i compiti cognitivi, fare calcoli matematici e riconoscere diversi suoni dall'ambiente; tra quelli motori, camminare su traiettorie lineari e curvilinee. Questi compiti hanno costituito il paradigma dell'esperimento neurofisiologico e sono stati eseguiti in modalità singola e doppia per studiare l'interferenza cognitivo-motoria in due gruppi costituiti da 12 soggetti sani (7 femmine, età=39,8±11,4 anni) e 12 persone con SM (10 femmine, età media=46.6±10.1 anni, EDSS=2.75±1.34).

Per valutare l'attività cerebrale durante i DT, è stato progettato un montaggio fNIRS con 32 optodi che coprissero le aree prefrontali (aree di Brodmann-BA 9,10,11), premotorie (BA 6), sensori-motorie (BA 1,2,3,4) e parietali associate (BA 5,7,40). Gli optodi sono stati quindi isolati con una cuffia supplementare per evitare interferenze con il sistema optoelettronico utilizzato per ottenere parametri cinematici (i.e. lunghezza del passo e velocità del centro di massa) durante l'esperimento.

La deambulazione su percorso curvilineo e le condizioni di DT hanno indotto entrambi i gruppi a eseguire passi più brevi e a camminare più lentamente. Tuttavia, le persone con SM hanno presentato una maggiore variabilità del passo (i.e., una maggiore instabilità) durante la camminata curvilinea in modalità di singolo compito, nonostante ponessero la priorità sull'aspetto motorio rispetto al cognitivo, come mostrato dal calcolo del costo. Ciò può indicare un effetto altamente negativo della camminata curvilinea in persone con SM. Per quanto riguarda i correlati neurali, solo il gruppo di persone

con SM ha mostrato un'attivazione delle aree premotorie (BA 6) durante singoli compiti, suggerendo che una semplice attività motoria come camminare può essere percepita come difficile. Inoltre, il reclutamento di aree prefrontali era più pronunciato in persone con SM rispetto ai controlli sani in tutte le condizioni sperimentali.

CONCLUSIONI

Questo studio ha fornito un nuovo strumento (DIDA-Q), che è una scala breve, valida e affidabile per misurare l'impatto del DT sulle attività della vita quotidiana in persone con SM. Il DIDA-Q può essere usato per identificare i DT percepiti come più difficili da eseguire dalle persone con SM e per valutare gli effetti dei trattamenti riabilitativi nella SM. Tutti i partecipanti hanno eseguito l'esperimento senza ri-

portare eventi avversi e la qualità del segnale fNIRS si è rivelata accettabile in tutti i canali.

I risultati preliminari suggeriscono che le persone con SM possono sperimentare l'effetto dannoso dell'interferenza cognitivo-motoria in quanto il compito motorio in sé, sebbene si tratti di una semplice camminata, richiede una pianificazione motoria che coinvolge le aree premotorie e prefrontali. Per questo motivo, i compiti cognitivi aggiuntivi possono portare a diverse strategie di prioritizzazione e alla riduzione della stabilità.

In futuro, sono raccomandati lavori per fornire metodologie standard di analisi dei dati fNIRS e studi longitudinali per determinare l'effetto della riabilitazione sui correlati comportamentali e neurali dell'interferenza cognitivo-motoria in persone con SM.

Behavioural and neural correlates of dual tasks negotiation in ecological setting: an fNIRS study to investigate cognitive-motor interference after rehabilitation in people with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Everyday activities often require to perform both a motor and cognitive task at once (dual tasks, DT), with consequent increased demand of neural resources and possible occurrence of cognitive-motor interference (e.g., performance decrement during DT). In people with multiple sclerosis (PwMS), this may lead to increased risk of falls while walking in the real world. It is now possible to investigate cortical activations in natural settings using functional near-infrared spectroscopy (fNIRS), an optical imaging method that measures the oxygenated and deoxygenated haemoglobin concentration changes.

Aims of this project were to identify the mostly impacting DT in multiple sclerosis (MS) by developing and validating a new questionnaire; to investigate behavioural and neural correlates during DT negotiation in ecological setting in healthy controls (HC) and PwMS; to assess neural processes underlying functional recovery driven by rehabilitation in PwMS.

RESULTS

A new questionnaire, named DIDA-Q, was developed including 20 daily-life activities involving motor or cognitive demands. Participants (N=215 PwMS; 155 females; age=49.8±12.8, range 18-85 years; EDSS=4.1±1.6) were asked to rate the level of perceived difficulty when performing two of them simultaneously.

Exploratory factor analysis showed that a model built on

19 items (one item has been deleted due to low loadings) yielded a three-factor solution, which cumulatively accounted for 69.5% of the total variance. The three factors concerned balance and mobility (six items), cognition (eight items) and upper-limb abilities (five items).

Results provided by DIDA-Q allowed us to detect the real-life DT perceived by PwMS as the most difficult to perform. The following tasks were identified: mathematical calculation and discriminating different sounds from the environment, among the cognitive tasks; walking on linear and curvilinear trajectories, among the motor tasks. These tasks constituted the paradigm for the neurophysiological experiment, and were performed in single and dual modality in order to study cognitive-motor interference in two groups of 12 HC (F=7, age=39.8 ± 11.4 years) and 12 PwMS (F=10, mean age=46.6 ± 10.1 years, EDSS=2.75±1.34).

In order to assess brain activity during DT, an fNIRS montage with 32 optodes covering prefrontal (Brodmann areas-BA 9,10,11), premotor (BA 6), primary sensorimotor (BA 1,2,3,4) and associative parietal (BA 5,7,40) regions was designed. The optodes were then isolated with a supplementary cup to avoid interference from the optoelectronic system used to obtain kinematic parameters (i.e., step length and center-of-mass velocity) during the experiment.

We found that curvilinear walking and DT conditions induced both groups to perform shorter steps and to walk

slower. However, PwMS presented increased step variability (i.e., higher instability) during curvilinear walking in single task, despite of the prioritization of the motor over the cognitive task, as shown by the dual task cost computation. This may indicate a highly detrimental effect of curvilinear walking in PwMS.

Concerning neural correlates, only PwMS showed an activation of premotor areas (BA 6) during single tasks, suggesting that a simple motor demand such as walking can be perceived as difficult in this population. Moreover, recruitment of prefrontal areas was more pronounced in PwMS than in HC in all experimental conditions.

CONCLUSIONS

This study provided a new instrument (DIDA-Q), which is a brief, valid and reliable scale for measuring DT impact on daily-life activities in PwMS. It can be used to identify the most detrimental task perceived by PwMS and as outcome measure to evaluate the effects of rehabilitative

treatments in MS.

The integrated assessment of brain activity and behavioural performance during DT using fNIRS seems to be feasible in PwMS, since all participants performed the experiment without complaining any adverse event and fNIRS signal quality was acceptable-to-good in all channels.

Preliminary results suggest that PwMS can experience the detrimental effect of cognitive-motor interference since the motor task per se, although it was a simple walk, required motor planning, involving premotor and prefrontal cognitive brain areas. For this reason, the additional cognitive tasks, may lead to different prioritization strategies and to decreased stability with respect to HC.

Future works are needed in order to provide standard methodologies of fNIRS data analysis and longitudinal studies should be implemented to investigate the effect of rehabilitation on behavioural and neural correlates of cognitive-motor interference in PwMS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pedullà L, Ponzio M, Tacchino A, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. Development and validation of the "Dual-task Impact on Daily-life Activities Questionnaire": preliminary evaluation in people with multiple sclerosis. RIMS - Rehabilitation in Multiple Sclerosis, Amsterdam, 2018 May 31st-June 2nd
- Pedullà L, Bonzano L, Bisio A, Job M, Brichetto G, Bove M. Neural correlates of dual task cost in ecological settings: preliminary results in healthy subjects of an fNIRS study. Special Interest Group SIG-Mobility of RIMS, Glasgow, 2018 September 28-29th
- Pedullà L, Bisio A, Bonzano L, Canepa P, Adascalitei S, Brichetto G, Bove M. Cognitive cost and brain activity during dual tasks: an fNIRS study in young adults. X National Congress of the Italian Motor and Sport Science Society, Messina, 2018 October 5-7th
- Pedullà L, Bonzano L, Bisio A, Job M, Tacchino A, Brichetto G, Bove M. Investigating behavioral and neural correlates of cognitive-motor interference in people with multiple sclerosis. Workshop Innovation in Rehabilitation Technologies, Genoa, 2019 March 5th
- Pedullà L, Bonzano L, Bisio A, Job M, Brichetto G, Bove M. Neural correlates of cognitive-motor dual tasks. Organization of Human Brain Mapping, Rome, 2019 June 10-13th
- Pedullà L, Bonzano L, Bisio A, Job M, Tacchino A, Brichetto G, Bove M. Effects of curvilinear walking and cognitive-motor dual tasks on motor performance and cortical activity in people with multiple sclerosis. RIMS, Lubiana, 2019 June 20th-22nd

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €
Research Fellowship funded by FISM Grant 2016 for the period of 2 years and the amount of € 50,000

Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva con Hcoil per potenziare gli effetti della riabilitazione cognitiva nelle persone con sclerosi multipla progressiva



Raffaella Chieffo

Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Letizia Leocani, Giancarlo Comi, Mauro Comola, Monica Falautano, Martina Congiu

PREMESSE E OBIETTIVI

Il deficit cognitivo è uno dei sintomi più disabilitanti per i soggetti affetti da sclerosi multipla progressiva (SMP) in quanto impatta sull'autonomia e sulla qualità di vita. La riabilitazione cognitiva, considerata ad oggi come uno degli approcci terapeutici più accettati, ha dei limiti in efficacia e durata dell'effetto. La stimolazione cerebrale non invasiva è in grado di modulare l'attività corticale e favorire la plasticità cerebrale. In associazione con la riabilitazione cognitiva potrebbe pertanto aumentarne l'efficacia. L'Hcoil è un device disegnato per stimolare le regioni frontali bilateralmente e simultaneamente. In questo studio pilota abbiamo valutato l'effetto combinato della stimolazione cerebrale non invasiva (rTMS) e riabilitazione cognitiva computerizzata (RehaCom software) rispetto alla sola riabilitazione cognitiva (+rTMS sham). Abbiamo preventivato di arruolare 20 soggetti. Il trattamento prevedeva 12 sessioni nell'arco di 3 settimane.

RISULTATI

Ad oggi sono stati arruolati 20 soggetti affetti da SMP come previsto dallo studio. Al termine delle 12 sessioni di trattamento cognitivo (+ rTMS real o placebo) abbiamo osservato un miglioramento significativo della velocità di processamento delle informazioni e dell'attenzione sostenuta persistente al follow-up a 3 mesi. Abbiamo inoltre riscontrato un miglioramento transitorio della fatica. In relazione ai risultati incoraggianti ottenuti sull'intero gruppo, abbiamo deciso di aumentare il campione di studio e proseguire con l'arruolamento rimanendo in cieco sui trattamenti rTMS ad oggi effettuati. Non sono state, pertanto, effettuate analisi di gruppo (real vs sham rTMS).

CONCLUSIONI

La riabilitazione cognitiva è indicata nei pazienti con forme progressive di sclerosi multipla al fine di potenziare i deficit cognitivi come l'attenzione, la memoria e la velocità di processamento delle informazioni. Resta da indagare il ruolo della stimolazione transcranica non invasiva.

Repetitive transcranial magnetic stimulation with the H-coil to enhance the effects of cognitive rehabilitation in people with progressive multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Cognitive impairment is one of the most disabling symptoms in progressive multiple sclerosis (PMS), impairing daily living activities and quality of life. Cognitive rehabilitation (CR), at present the most accepted approach for the treatment of cognitive impairment, has limits in efficacy and duration of effects, bringing the need for further exploring methods to enhance its restorative potential. Non-invasive transcranial brain stimulation techniques, such as repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) have been demonstrated to modulate cortical plasticity and to enhance the effects of physical and cognitive rehabilitation in several neurological conditions. In MS, cognitive impairment results from the disruption of several cortico-cortical and cortico-subcortical networks, thus posing limits of stimulation targeting. H2-coil device has been designed for delivering a wider stimulation field allowing stimulating the frontal regions bilaterally and simultaneously. This pilot study aimed at investigating if excitatory rTMS could boost the effect of cognitive training in people with pMS and cognitive impairment. We planned to enroll twenty subjects with PMS showing poor cognitive performance. Treatment consisted in 12 sessions of computerized CR with the RehaCom software plus real or sham rTMS within 3 weeks.

RESULTS

PMS subjects with cognitive deficits underwent 12 sessions of computerized cognitive training (with the RehaCom software) plus real or sham rTMS within 3 weeks. An overall and subsistent, up to 3 months, improvement of processing speed and executive performances was observed after treatment. Also fatigue symptom transiently ameliorated. Group analysis (real vs sham rTMS) have not been performed in order to maintain blindness on subject allocation and continuing patient enrollment.

CONCLUSIONS

Cognitive training is recommended in people with progressive forms of multiple sclerosis for improving cognitive deficits consisting in processing speed and attention impairment. The role of transcranial magnetic stimulation remain to be investigated.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 12 months) and the amount of € 30,000

Effetti della rTMS con H-Coil sulla capacità deambulatoria nella sclerosi multipla: studio di fase III controllato, randomizzato doppio cieco



Letizia Leocani

Fondazione Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Giancarlo Comi, Arturo Nuara, Simone Guerrieri, Marco Pisa, Antonino Giordano, Francesco Vitali, Marta Lamperti, Elisa Compierchio, Alessia Secci, Anastasia Cecchetti, Raffaella Battisti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Marco Rovaris, Centro Sclerosi Multipla IRCCS S. Maria Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano

PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto in questione consiste in uno studio nazionale multicentrico, randomizzato in doppio cieco controllato con placebo. Lo studio prevede l'arruolamento di 100 pazienti affetti da sclerosi multipla in fase progressiva di malattia, con problematiche della deambulazione. I pazienti arruolati saranno sottoposti a sessioni di stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS) ad alta frequenza o in alternativa a sessioni di stimolazione placebo, della durata di 20 minuti ciascuna per un totale di 11 sedute complessive.

Le sedute saranno distribuite nell'arco di 3 settimane e saranno erogate a seguito di sedute di riabilitazione. Lo studio prevede valutazioni cliniche eseguite prima dell'inizio delle sedute di stimolazione (T0), al termine della prima settimana (W1) e al termine della seconda settimana (W2), al termine della terza settimana (W3), con due ulteriori valutazioni previste rispettivamente a 1 (F1) e 3 (F3) mesi dal termine delle sedute di stimolazione. L'outcome primario dello studio consiste nella valutazione del miglioramento (espresso come variazione percentuale confrontando le performance rilevate rispettivamente pre e post-sedute di stimolazione) relativo sia alla resistenza (tramite test dei 6 minuti) che alla velocità (tramite test dei 10 metri) nel cammino.

Gli outcome secondari dello studio sono invece i seguenti: disabilità (valutata tramite scala EDSS), spasticità (valutata sia tramite scala di Ashworth modificata - MAS, sia tramite scala visuo-analogica - VAS), dolore (valutato tramite VAS), nonché i punteggi ottenuti al paced auditory serial

addition test (PASAT), al nine-Hole Peg Test (9HPT) e alle seguenti scale autosomministrate (fatigue severity scale - FSS per quanto concerne la fatica, e MS walking scale - MSWS in 12 punti per quanto riguarda il cammino).

RISULTATI

A partire da maggio 2014, un totale di 633 pazienti affetti da sclerosi multipla sono stati valutati per l'eventuale arruolamento nello studio presso l'Ospedale San Raffaele di Milano. Di questi, 92 pazienti sono stati effettivamente arruolati presso tale centro; 462 infatti non rispettavano i criteri di inclusione / esclusione previsti dallo studio, mentre 80 pazienti hanno rifiutato l'eventuale partecipazione al protocollo di ricerca.

Ulteriori 17 pazienti sono stati arruolati presso la Fondazione Don Carlo Gnocchi di Milano, per cui un totale di 109 pazienti è stato incluso nello studio ed è stato sottoposto a procedura di randomizzazione, come da protocollo sperimentale. Siccome 9 pazienti (drop-out) non hanno terminato le procedure previste dal protocollo sperimentale, le misure di outcome sono state raccolte per un totale di 100 pazienti (per 3 dei quali la valutazione F3 è prevista tra febbraio e aprile 2020). Per quanto riguarda la sicurezza del trattamento, al momento non abbiamo riscontrato alcun evento avverso serio. Le misure di efficacia non sono invece attualmente disponibili, in quanto non si è ancora proceduto all'apertura del cieco.

CONCLUSIONI

I risultati relativi all'efficacia del trattamento oggetto di

studio non sono attualmente disponibili. L'apertura del cieco e l'esecuzione delle analisi statistiche è prevista nei prossimi mesi, in seguito all'esecuzione della valutazione

F3 da parte dell'ultimo paziente arruolato, come da protocollo sperimentale.

Effect of rTMS with H-coil for lower limb disturbances associated with walking disability in MS: a controlled, randomized, double blind Phase III study

INTRODUCTION AND AIMS

A multicenter, national comparative randomized double blind placebo/control clinical trial. The study population will be composed of 100 patients suffering from progressive multiple sclerosis with a walking impairment. Patients will receive 20-min sessions of high-frequency rTMS for 3 weeks following their rehabilitation sessions.

Clinical examination with testing of outcome measures will be performed at baseline (T0), at the end of the 1st week (W1), at the end of the 2nd week (W2), at the end of the 3rd week (W3) of treatment, with follow-ups at 1 month (F1) and 3 months (F3) after the end of treatment. Primary outcomes will be the improvement (percent change from baseline) of walking endurance (6 minutes walking test) and speed (10 meter walking test). Secondary outcomes will be: disability (EDSS), modified Ashworth scale (MAS) of spasticity, visual analogue scale (VAS) for pain and spasticity, paced auditory serial addition test (PASAT), nine-Hole Peg Test (9HPT) self-administered scales of fatigue (fatigue severity scale-FSS) and walking (12-item MS walking scale-MSWS).

RESULTS

Since may 2014 a total number of 633 MS patients have been pre-screened at San Raffaele Hospital for inclusion in the protocol. Among these patients 92 have been enrolled in the study at this center, 462 did not respect inclusion / exclusion criteria while 80 refused to participate. Considering also the 17 patients enrolled at Fondazione Don Carlo Gnocchi, at present a total of 109 progressive MS patients have been enrolled in the study and underwent randomization as per protocol. Outcome measures have been collected for 100 patients, since we had 9 drop-outs after randomization procedure. So far, as expected, we did not record any serious adverse event. Efficacy outcomes are not yet available, since blind codes have not been broken.

CONCLUSIONS

Results concerning efficacy outcomes are not yet available, because blind has not been broken. Our aim is to enroll 100 patients with complete study records; unblinding and following statistical analysis are therefore scheduled in the coming months.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- A paper containing neurophysiological outcomes (motor evoked potentials) without opening blinding has been published on *Clinical Neurophysiology*: Pisa M. Chieffo R. Giordano A. Gelibter S. Comola M. Comi G. Loecani L., Upper limb motor evoked potentials as outcome measure in progressive multiple sclerosis, *Clinical Neurophysiology*, Volume 131, Issue 2, February 2020, Pages 401-405

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2012 per il periodo di 2 anni (prorogato di 2 anni e 9 mesi) e l'ammontare di 178.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 2 years and 9 months) and the amount of € 178,000

La stimolazione spinale transcutanea a corrente continua e la stimolazione transcranica a corrente continua come strumenti per migliorare la spasticità nella sclerosi multipla



Alberto Priori

Università degli Studi di Milano, Centro di Ricerca 'Aldo Ravelli', Dipartimento di Scienze della Salute, Milano

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Roberta Ferrucci

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Sergio Barbieri, U.O. di Neurofisiopatologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Marta Parazzini, Istituto di Elettronica e di Ingegneria dell'Informazione e delle Telecomunicazioni, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IEIT CNR), Milano

Simona Mrakic-Sposta, Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR), Milano

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) che comporta la manifestazione di diverse disfunzioni neurologiche, compresa la spasticità. Quest'ultima si manifesta con rigidità muscolare, spasmi e dolori, in particolare agli arti inferiori, e influisce negativamente sulla qualità di vita della persona. Lo stress ossidativo (OxS) gioca un ruolo chiave nella patogenesi della SM e le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), se prodotte in eccesso sono parte in causa della demielinizzazione e del danno assonale.

Le opzioni terapeutiche per la cura della spasticità sono limitate e generalmente i pazienti non presentano una risposta soddisfacente ai farmaci antispastici orali.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato gli effetti positivi della neuromodulazione non invasiva nella SM. Due tecniche di neuromodulazione non invasiva, basate sull'applicazione di corrente continua (DC) di lieve intensità, la stimolazione transcranica a corrente continua (tDCS) e la stimolazione transcutanea spinale a corrente continua (tsDCS), inducono cambiamenti nell'eccitabilità corticale motoria e nelle funzioni del midollo spinale che persistono per quasi un'ora dal termine della stimolazione.

Abbiamo voluto pertanto focalizzarci sullo studio dei meccanismi che sottostanno alla modulazione prodotta dalla DC sulla spasticità, sia a livello centrale che spinale, attraverso lo studio dei biomarcatori ematici di stress ossidativo e di infiammazione, unitamente agli aspetti clinici e neurofisiologici.

RISULTATI

I dati preliminari, seppure su un campione piccolo (7 soggetti) indicano che il trattamento con tDCS, in particolare il modello che prevede la stimolazione cortico-spinale, suggerisce un riequilibrio dello stato ossidativo, con diminuzione delle specie reattive dell'ossigeno e aumento della capacità antiossidante. Inoltre le correnti DC, sembrano avere un potenziale benefico sui fenomeni di rigenerazione nervosa.

CONCLUSIONI

In conclusione, la stimolazione cortico-spinale sembra essere la più adatta per migliorare lo stress ossidativo e il relativo danno neuronale. Per confermare i nostri dati, sarà necessario valutare un campione più grande.

Transcutaneous spinal cord and transcranial direct current stimulation as tools to improve spasticity in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Spasticity is one of the most common disabling MS symptoms. Spasticity can be defined as a velocity dependent increase in muscle tone following hyperexcitability of the stretch reflex secondary to lesion of the corticospinal tract. MS is a multifactorial disease of the CNS in which both inflammatory and neurodegenerative processes occur simultaneously.

Two neuromodulatory techniques based on applying direct current (DC) noninvasively through the skin, transcranial direct current stimulation (tDCS) and transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS), at weak intensities and for long periods induce changes in motor cortical excitability and in spinal cord function that persist for almost one hour after current offset and depend on current polarity. These physiological changes may be correlated to some clinical benefits observed in MS after tDCS and, possibly, to changes in the neuroinflammatory cascade. For instance, our group reported that tDCS can improve fatigue in patients with MS. The electric field have a well known effect on inflammation and glial activation. However, the symptomatic relief induced by DC-related stimulation techniques on MS-spasticity has not been yet been demonstrated in large controlled trials, and the potential

mechanisms of DC stimulation action on neuroinflammation remain unclear. We therefore aim to investigate in patients with MS the clinical and neurophysiological effects of DC-related neuromodulation techniques at both central and spinal level on spasticity, and their potential mechanisms of action on neuroinflammation through the assessment of biomarkers for oxidative stress and inflammation. The present project aims to improve our understanding of MS pathophysiology and represents an innovative approach in the management of MS. The proposed therapy is safe, feasible and may bring symptomatic motor improvement.

RESULTS

Our preliminary results on a small sample size (n=7) showed that cortico-spinal stimulation modulates the oxidative state, with a decrease in the reactive oxygen species and increased antioxidant capacity. Furthermore, DC currents seem to have a beneficial potential on the phenomena of neuroregeneration.

CONCLUSIONS

In conclusion cortico-spinal stimulation seems to be the most suitable to improve the oxidative stress and related neurodamage. To confirm our data, a larger sample size is needed.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

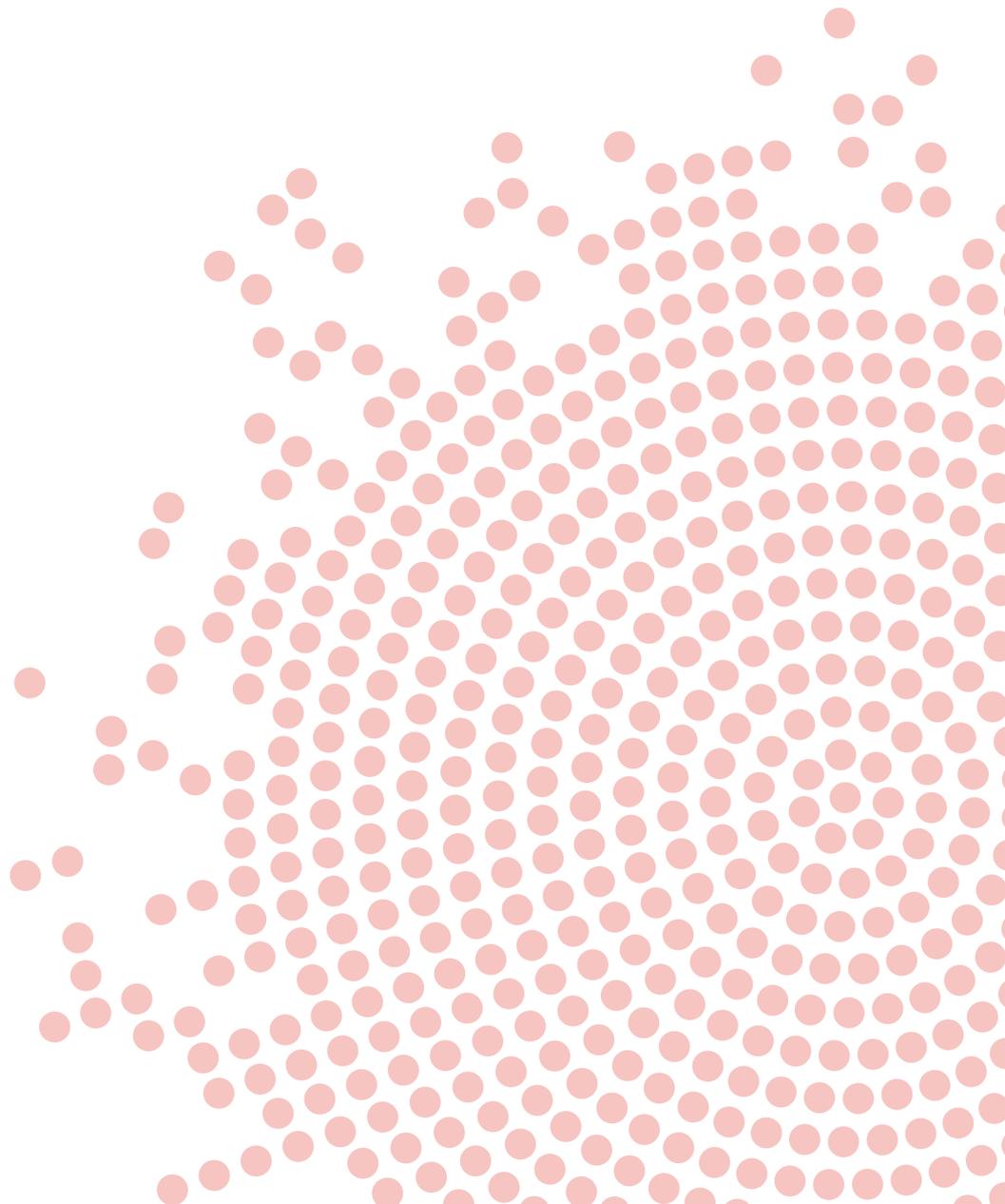
- Fiocchi S, Chiaramello E, Priori A, Ravazzani P, Parazzini M. Modelling of the temperature changes induced by transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS), *Journal of Electromagnetics, RF, and Microwaves in Medicine and Biology* 2020 DOI: 10.1109/JERM.2020.2967595

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

Patogenesi e fattori di rischio

Pathogenesis
and risk factors



Studio di un nuovo meccanismo di innesco della sclerosi multipla mediato dal batterio non-typeable *Haemophilus influenzae*



Vincenzo Brescia Morra

Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche,
Università "Federico II" di Napoli, Napoli

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Roberta Lanzillo, Chiara Criscuolo, Martina Petruzzo, Anna Lamberti, Paola Salvatore, Chiara Pagliuca, Roberta Colicchio, Elena Scaglione, Michele Cavaliere

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Anna Maria Papini, Feliciano Real-Fernández, Francesco Lolli, Peptlab,
Università degli Studi di Firenze, Firenze

Marcello Mancini, Rita Berisio, CNR, Napoli

PREMESSE E OBIETTIVI

Oltre alla predisposizione genetica, vari fattori ambientali sono stati associati allo sviluppo della sclerosi multipla (SM). Tra questi le infezioni batteriche e virali sono tra le prime candidate, a causa della capacità di questi patogeni di innescare forti reazioni immunitarie, tali da indurre fenomeni di autoimmunità. Data la complessità della malattia, è assolutamente cruciale la comprensione dei meccanismi che possono innescarla. Studi preliminari condotti in collaborazione tra i partner di questo progetto hanno evidenziato la presenza di anticorpi contro una delle più importanti adesine del batterio *Haemophilus influenzae*, HMWA1, in pazienti con SM. Nello specifico, questa adesina glicosilata riconosce selettivamente anticorpi nei sieri di pazienti con SM, un risultato che identifica questi anticorpi come potenziali fattori coinvolti nel rischio di sviluppare SM.

Lo scopo principale di questo progetto è comprendere quale è il meccanismo molecolare che consentirebbe al batterio di favorire o innescare lo sviluppo della SM. A tal fine proveremo a rispondere alla domanda perché i sieri di persone con SM contengono anticorpi contro HMW1A. Seguiremo l'ipotesi più probabile dell'infezione commensale.

La pelle e le mucose dell'uomo sono colonizzate in permanenza da batteri commensali tra cui *Haemophilus influenzae*, che giocano un ruolo fondamentale nella resistenza alle infezioni, stimolando di continuo il sistema

immunitario e impedendo, con la loro semplice presenza (effetto barriera), l'attecchimento di batteri patogeni. In caso di infezione commensale, nel siero di un individuo dovrebbero essere presenti gli anticorpi ma non l'antigene adesivo HMW1A, poiché quest'ultimo dovrebbe essere adeso esclusivamente alla mucosa delle vie respiratorie. Nel caso in cui la risposta del sistema immunitario fosse alterata potremmo trovare anche l'antigene nel siero, a questo scopo, utilizzeremo anticorpi contro HMW1A glicosilati per cercare HMW1A nel siero di soggetti con SM, utilizzando i test ELISA. Abbiamo anche l'obiettivo di una valutazione clinica dell'infezione commensale come trigger di SM. Questo obiettivo sarà raggiunto attraverso uno studio della colonizzazione di *Haemophilus influenzae* nel tratto respiratorio mediante tamponi nasofaringei.

RISULTATI

Inizialmente sono stati sottoposti a screening 50 pazienti con SM, i cui sieri erano stoccati nella banca dati del centro SM, per selezionare un'ulteriore coorte di pazienti in base alle loro caratteristiche cliniche e ai titoli anticorpali. Non tutti i soggetti hanno aderito al secondo test, quindi solo 37 persone con SM e 23 controlli sono stati testati nuovamente contro HMW1ct-Glc e la corrispondente proteina non glicosilata seguendo il protocollo precedentemente descritto. I risultati hanno mostrato differenze significative nei livelli di anticorpi IgM rispetto a HMW1 e HMW1Glc ($p = 0,0005$) tra persone con SM e controlli.

Non sono state osservate differenze significative per i livelli di anticorpi di tipo IgG. Questi risultati confermano i dati precedentemente pubblicati. Quindi, è stata eseguita un'analisi microbiologica per valutare la positività dei soggetti studiati, alla colonizzazione commensale di *Haemophilus influenzae* non tipizzabile e di altri agenti patogeni batterici graditi a *Haemophilus influenzae* nell'alto tratto respiratorio, attraverso tamponi oro e rino-faringei. L'analisi statistica non ha rivelato differenze significative nei titoli di anticorpi tra persone positive o negative al tampone per *Haemophilus influenzae* non tipizzabile (NT-Hi).

CONCLUSIONI

I nostri dati confermano la presenza di un aumentato titolo di IgM contro HMW1ct-Glc nelle persone con SM

rispetto ai controlli, indipendentemente da una colonizzazione commensale di *Haemophilus influenzae*. Questo sembrerebbe indicare la presenza nel siero delle persone con SM, di un anticorpo in grado di cross-reagire con l'antigene HMW1 glicosilato. È noto che questo microorganismo ha una patogenicità multiforme, e ci sono prove crescenti che NT-Hi invade e persiste all'interno di varie cellule epiteliali respiratorie, spiegando l'assenza di correlazione con la positività dei tamponi rino-faringei. Il ruolo di tale capacità invasiva nella patogenesi non è ancora del tutto chiaro; tuttavia, le osservazioni secondo cui le infezioni da NT-Hi persistono e si ripresentano spesso nonostante la terapia antibiotica, associata a indagini microbiologiche colturali negative, suggeriscono che l'ambiente intracellulare potrebbe fungere da serbatoio protettivo per la persistenza di questo microorganismo.

Understanding a new trigger mechanism in multiple sclerosis mediated by the non-typeable *Haemophilus influenzae* bacterium

INTRODUCTION AND AIMS

In addition to genetic predisposition, various environmental factors have been associated with the development of multiple sclerosis (MS). Among these, bacterial and viral infections are the first candidates, due to the ability of these pathogens to trigger strong immune reactions, and autoimmunity phenomena. Given the complexity of the disease, understanding the mechanisms that can trigger it is absolutely crucial. Preliminary studies conducted in collaboration between the Partners of this project have highlighted the presence of antibodies against one of the most important adhesives (HMW1A) of the *Haemophilus influenzae* bacterium, in patients with MS. Specifically, in the sera of MS patients are present antibodies that react with this glycosylated adhesion, identifying these antibodies as potential prognostic risk factors. The main purpose of this project is to try to understand which is the molecular mechanism that allows the bacterium to favor or trigger the development of MS. Therefore we will try to answer why MS patients' sera have antibodies against HMW1A. We will follow the most probable hypothesis of commensal infection.

Human skin and mucous membranes are permanently colonized by commensal bacteria including *Haemophilus influenzae*, which play a fundamental role in resistance to infections, continuously stimulating the immune system and preventing, with their simple presence (barrier effect), the engraftment of pathogenic bacteria.

In this scenario, if the infection is commensal, the serum

contains antibodies but not HMW1A adhesive, because it should exclusively adhere to the mucosa in this state of disease. For this purpose, we will use ELISE to test antibodies against HMW1A glycosylates in the MS patients' sera. We also evaluate from a clinical point of view the hypothesis of the commensal infection as an MS trigger. This goal will be achieved through a study on colonization of *H. influenzae* in the respiratory tract using nasopharyngeal swabs.

RESULTS

Initially 50 MS sera were screened to select a further cohort of patients depending on their clinical features and antibody titers. Then 37 Multiple Sclerosis (MS) affected people and 23 controls were tested against HMW1ct-Glc and the corresponding unglycosylated protein following the previously described protocol. Results showed discriminant differences in IgM antibody levels against HMW1 and HMW1Glc groups (P value = 0.0005, two-tailed) between MS sera and controls. No significant differences were observed for IgG-type antibody levels between the two groups.

These results confirm the previously published data. Then, was performed the microbiological analysis to evaluate the positivity of patients to commensal colonization of non-typeable *H. influenzae* and other bacterial pathogens linked to *H. influenzae* in the upper respiratory tract, through oropharyngeal and rinopharyngeal swabs.

Statistical analysis revealed no significant differences in antibody titers between MS people positive or negative to non-typable H. Influenzae (NT-Hi).

CONCLUSIONS

Our data confirm the presence of an increased IgM titre against HMW1ct-Glc in MSers compared to controls, regardless of commensal colonization of Haemophilus influenzae. This would seem to indicate the presence in the serum of people with MS of an Ab capable of cross-re-

acting with the glycosylated HMW1 antigen.

It is known that this microorganism has multi-faceted pathogenicity, and there is increasing evidence that NT-Hi invades and persists within various respiratory epithelial cells. The role of this local invasive capacity in pathogenesis is unclear; however, observations that NT-Hi infections frequently persist and recur despite antibiotic therapy and culture-negative laboratory investigations suggested that the intracellular environment might act as a protective reservoir for persistence.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Role of non-typeable Haemophilus influenzae in the pathogenesis of Multiple Sclerosis: a novel triggering mechanism. 47° National Congress of Italian Society of Microbiology, Rome 18-21 September 2019*
- *Elucidation of a novel triggering mechanism of Multiple Sclerosis mediated by non-typeable Haemophilus influenza. Presented as conference abstract and poster at:*
 - *II edition of Junior Accademy of Multiple Sclerosis, Anacapri (NA) 23-25 May 2019*
 - *Annual Scientific Congress Italian Multiple Sclerosis and its Foundation, Rome 29-31 May 2019*
 - *8° Giornata dello Specializzando in Neurologia, Catania 11 June 2019*
 - *50° National Congress of Italian Society of Neurology, Bologna 12-15 October 2019*

Progetto di ricerca finanziato con il bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

La gravidanza: un potente fenomeno transitorio di immunosoppressione nelle donne con sclerosi multipla



Michela Spadaro

Neurologia, Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CRESM),
AOU San Luigi Gonzaga, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano, Torino

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Simona Perga, Francesca Montarolo, Serena Martire, Federica Brescia, Paola Valentino, Fabiana Marnetto, Antonio Bertolotto

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Luca Marozio, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Torino, Torino

PREMESSE E OBIETTIVI

La gravidanza è uno stato fisiologico di complessa immunomodulazione nel quale il sistema immunitario materno si adatta alla presenza del feto esprimente antigeni paterni permettendone la crescita. Un ruolo centrale in questo processo è svolto dalla placenta e dai fattori che essa rilascia. Tra questi vi sono le vescicole extracellulari (VE), un particolare meccanismo di comunicazione e scambio di materiale tra cellule, con effetti anche di tipo immunomodulante. È noto che la gravidanza migliora il decorso della sclerosi multipla (SM) riducendo la frequenza di recidive, in particolare nel terzo trimestre. I meccanismi alla base di questo fenomeno non sono ancora chiari, tuttavia studi condotti su un modello murino sperimentale di SM hanno mostrato che le VE rilasciate nel circolo ematico in corso di gravidanza hanno un effetto inibitorio sulla proliferazione dei linfociti T, una delle popolazioni cellulari maggiormente coinvolte nella patogenesi della malattia.

Ad oggi non esistono dati relativi alle caratteristiche e al ruolo delle VE placentari isolate da donne con SM. Per questo motivo, il nostro studio ha come obiettivi la caratterizzazione dei marcatori di superficie delle VE secrete dal versante materno (decidua) e da quello fetale (trofoblasto) della placenta di pazienti con SM e donatrici sane e la valutazione degli effetti che tali VE possono avere su popolazioni cellulari coinvolte nella patogenesi della SM come monociti e linfociti T regolatori.

RISULTATI

Grazie alla collaborazione con il Prof. L. Marozio del Dipartimento di Discipline Ostetriche e Ginecologiche dell'Uni-

versità degli Studi di Torino abbiamo raccolto campioni di tessuto placentare post-parto di 14 pazienti con SM e 14 controlli sani. Abbiamo isolato e quantificato con successo le VE secrete in coltura da entrambe le componenti della placenta, decidua e trofoblasto, senza evidenziare differenze nella resa e nelle dimensioni in base al tipo di tessuto e allo stato di malattia della donatrice. Tramite citofluorimetria a flusso abbiamo caratterizzato l'espressione di 37 differenti marcatori di superficie presenti sulle VE: molti di questi hanno mostrato differenze di espressione in base al tipo di tessuto di origine ma non allo stato di malattia della donatrice, mentre un marcatore in particolare, CD133, è risultato maggiormente espresso dalle VE secrete da trofoblasto di pazienti rispetto ai controlli. Questo risultato appare interessante, dal momento che VE CD133+ sono comunemente rilasciate dalle cellule staminali durante il processo di differenziamento, incluse cellule staminali e progenitrici emopoietiche che daranno origine alle cellule del sistema immunitario.

In seguito abbiamo valutato la capacità delle VE di condizionare lo stato di attivazione di monociti CD14+ sottoposti a stimoli infiammatori. Per questo abbiamo confrontato il livello di espressione di un pannello di citochine pro e anti-infiammatorie da parte di monociti attivati con stimoli infiammatori e di monociti in cui l'attivazione è stata associata al condizionamento con VE. Dal confronto non sono emersi effetti significativi del condizionamento con le VE, tuttavia in alcuni esperimenti si è osservato una moderata diminuzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie come IL1-beta, IL6 e TNF-alfa in seguito al condizionamento con VE placentari di donatrici con SM. Infine abbiamo valu-

tato la capacità delle VE di condizionare l'attività inibitoria dei linfociti T regolatori sulla proliferazione dei linfociti T CD4+ attivati. In questo contesto le analisi preliminari non hanno mostrato effetti significativi delle VE, per cui nuove analisi sono ora in corso per valutare gli effetti diretti delle VE sulla proliferazione linfociti T CD4+ attivati.

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di ottenere una prima caratterizzazione e valutazione funzionale delle VE placentari in

pazienti affette da SM, di cui non sono ad oggi disponibili descrizioni in letteratura. Il materiale raccolto permetterà di studiare gli effetti funzionali delle VE su altre sottopopolazioni cellulari coinvolte nella patogenesi della SM e *in vivo* sul modello murino di SM. In questo modo sarà possibile chiarire il contributo delle VE placentari agli effetti benefici che la gravidanza esercita sulla SM, con l'obiettivo di sfruttare tali conoscenze per delineare nuove prospettive terapeutiche.

Pregnancy: a powerful transient immunosuppressive phenomenon in multiple sclerosis women

INTRODUCTION AND AIMS

Pregnancy is a unique physiological condition of complex immunomodulation in which the maternal immune system adapts itself to the fetus which expresses paternally-inherited antigens and allows its growth. A central role in this adaptation is played by the placenta and its released factors, such as the extracellular vesicles (EV) which represent a peculiar mechanism of communication and material exchange between cells, with important immunomodulatory effects. It is well known by now that pregnancy improves the clinical course of multiple sclerosis (MS) with a significant reduction of the relapse rate, particularly in the third trimester. The molecular mechanisms behind this phenomenon have not been completely elucidated. However, studies conducted on an experimental murine model of MS have shown that EV shed into the blood during pregnancy have an inhibitory effect on the proliferation of T cells, one of the cell populations most involved in the pathogenesis of the disease. To date, there are no data available on the characteristics and role of the EV isolated from women with MS. For this reason, the main goals of this study are the characterization of the surface markers of the EV secreted by the maternal (decidua) and fetal (trophoblast) side of the placenta of patients with MS and healthy donors, and the evaluation of the effects of these EV on cell populations involved in the pathogenesis of MS such as monocytes and regulatory T lymphocytes.

RESULTS

Thanks to the collaboration with Dr. Marozio of the Department of Surgical Sciences, Obstetrics and Gynaecology of the University of Turin, we collected post-partum placenta samples from 14 women with MS and 14 healthy donors. We successfully isolated and quantified the

EV shed from both the placenta components, decidua and trophoblast. Quantity and dimension did not differ between EV based on the type of tissue of origin or the health status of the donor. We characterized by flow cytometry the expression level of 37 EV surface biomarkers. Most of them resulted differentially expressed between the EV released by decidua or trophoblast, but not between the EV shed by placental tissues of MS patients or healthy women, except for CD133. The expression of this protein was higher in the EV secreted by trophoblast of women with MS compared to healthy donors. Notably, CD133+ EV are commonly shed by differentiating stem cell, including hematopoietic stem and progenitor cells which will generate the immune system cells.

We evaluated the influence of EV on CD14+ monocytes activated with inflammatory stimuli. In particular, we compared the expression level of a panel of pro and anti-inflammatory cytokines in activated monocytes conditioned or not with EV. We did not observe significant effects, although in some experiments the conditioning with placental EV from women with MS was associated with a modest decrease in the expression level of pro-inflammatory cytokines such as IL1-beta, IL6 e TNF-alfa. Finally, we evaluated the influence of the EV conditioning on the inhibitory activity of regulatory T cells on activated CD4+ T cells. In this context, preliminary analyses did not show significant effects of the EV, thus new analyses to evaluate the direct effect of EV on CD4+ T cells are now underway.

CONCLUSIONS

For the first time to our knowledge, this study enabled a preliminary characterization of the EV shed by placental tissues of patients with MS. The collected samples will be used to investigate the effects of placental EV on other

cell populations involved in the MS pathogenesis and in the murine model of MS. The results will clarify the potential role of placental EV in the pregnancy-related improve-

ment of the MS disease, and could be exploited to define new therapeutic perspectives.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Spadaro M, Martire S, Marozio L, Mastromauro D, Montanari E, Perga S, Montarolo F, Brescia F, Balbo A, Botta G, Benedetto C, Bertolotto A. Immunomodulatory Effect of Pregnancy on Leukocyte Populations in Patients With Multiple Sclerosis: A Comparison of Peripheral Blood and Decidual Placental Tissue. *Front Immunol.* 2019 Aug 16;10:1935. doi: 10.3389/fimmu.2019.01935
- Spadaro M. Immunomodulatory Effect of Pregnancy on Leukocyte Populations in Patients with Multiple Sclerosis: a Comparison of Peripheral Blood and Decidual Placental Tissue. XX-VII AINI Congress, Camogli (Genoa), May 6-9th 2019

Progetto di ricerca finanziato con il bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

DAMPs mitocondriali nella sclerosi multipla: uno studio pilota



Andrea Cossarizza

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno Infantili e dell'Adulto,
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Milena Nasi, Elena Bianchini, Simone Pecorini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Anna Maria Simone, Unità di Neurologia, Ospedale di Carpi, AUSL Modena, Carpi (MO)

Diana Ferraro, Francesca Vitetta, Patrizia Sola, Dipartimento di Neuroscienze,
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena Ospedale Civile di Baggiovara, Baggiovara (MO)

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica infiammatoria demielinizante del sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzata da un decorso clinico eterogeneo e mediata dal sistema immunitario. In particolare, l'attivazione cronica e deregolata della microglia – le cellule dell'immunità innata presenti nel SNC – può portare a un'inflammatione persistente del SNC e contribuire alla progressione della malattia. Tuttavia, lo stimolo (o gli stimoli) che innescano e mantengono i processi infiammatori e l'attivazione della microglia non sono ancora del tutto chiari. Nella SM, stanno acquisendo importanza alcune molecole associate al danno cellulare, che prendono il nome di DAMP. Queste molecole, normalmente presenti all'interno di tutte le cellule, sono capaci di causare infiammazione quando rilasciate nell'ambiente extracellulare dalle cellule danneggiate o morte e quindi potrebbero contribuire all'innescamento e al mantenimento dei processi infiammatori e all'attivazione inappropriata della microglia nella SM.

A questo scopo, sono stati quantificati il DNA mitocondriale (mtDNA) e altre molecole pro-infiammatorie nel plasma di pazienti con SM progressiva, ed è stata valutata la loro correlazione con i parametri demografici/clinici. Successivamente, sono stati analizzati gli effetti dei DAMP di origine mitocondriale (MTD) sull'attivazione della microglia *in vitro*, utilizzando una linea cellulare di origine umana come modello sperimentale (cellule HMC3). Oltre all'mtDNA, sono stati analizzati gli effetti dei N-formil-peptidi e della cardiolipina (CL) sull'espressione di geni coinvolti nell'attivazione della microglia, sull'aumento di marcatori

di attivazione sulla superficie cellulare e sulla produzione di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS).

RISULTATI

Sono stati arruolati 73 pazienti con SM progressiva non trattati – 38 con forma secondariamente progressiva (SP) e 35 con forma primariamente progressiva (PP) – e 42 controlli sani (CTR). Per quanto riguarda i DAMP, l'mtDNA circolante ha una maggiore concentrazione nei pazienti con SM SP rispetto a quelli con SM PP, mentre i livelli di HMGB1 (una proteina che svolge un ruolo in diversi processi cellulari, tra cui infiammazione e differenziazione cellulare) non variano nei tre gruppi. Questo potrebbe indicare che il coinvolgimento dell'mtDNA nell'infiammazione è maggiormente associato a uno stadio cronico della malattia e in particolare nei pazienti con SM SP.

Considerando le citochine pro-infiammatorie, nei pazienti con SM PP i livelli plasmatici di fattore di necrosi tumorale (TNF)- α e interleuchina (IL)-8 sono maggiori rispetto ai CTR o rispetto ai pazienti con SM SP e ai CTR, rispettivamente, mentre tutti i pazienti progressivi hanno concentrazioni superiori di IL-6 e IL-1 β rispetto ai CTR. Inoltre, l'interferone- γ tende ad aumentare nei pazienti con SM PP rispetto a quelli con SM SP e ai CTR, così come nei pazienti con SM SP rispetto ai CTR. Questi risultati evidenziano la presenza di uno sbilanciamento di citochine nei pazienti progressivi, il quale potrebbe modulare l'attività e la progressione della malattia, e suggeriscono la possibilità di sviluppare nuovi farmaci diretti contro le citochine

o i loro recettori. Infine, nei pazienti con SM PP i livelli plasmatici di TNF- α correlano con il punteggio *Multiple Sclerosis Severity Score*.

Riguardo all'attivazione della microglia *in vitro* dopo stimolazione con MTD, l'mtDNA e la CL non aumentano l'espressione dei geni e delle molecole coinvolti nell'attivazione pro-infiammatoria, ma inducono un lieve aumento dello stress ossidativo, anche se non dell'anione superossido mitocondriale. Al contrario, gli N-formil-peptidi aumentano l'espressione di alcuni geni coinvolti nelle vie di attivazione della microglia, pur non inducendo cambiamenti nell'espressione di marcatori di attivazione sulla superficie cellulare, nel rilascio di citochine pro-infiammatorie e nella produzione di ROS. Questo potrebbe suggerire un ruolo dell'mtDNA e della CL nell'equilibrio tra funzioni pro- e

anti-infiammatorie della microglia e, quindi, nella regolazione endogena della neuroinfiammazione.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che, nella SM progressiva, l'aumento dei livelli plasmatici dell'mtDNA e delle citochine pro-infiammatorie contribuisca probabilmente allo stato infiammatorio sistemico dei pazienti, anche se la componente infiammatoria potrebbe essere attivata in maniera differente nelle due forme progressive della malattia. Inoltre, il nostro studio amplia la conoscenza circa gli stimoli che regolano gli stati di attivazione della microglia e mette in luce la possibilità di modularne la funzionalità attraverso gli MTD come nuova strategia terapeutica per la SM.

Mitochondrial DAMPs in multiple sclerosis: a pilot study

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disorder of the central nervous system (CNS), featured by a heterogeneous clinical course. In MS, inflammation is an important component of neurodegeneration, and the mechanisms driving disease development deeply involve the immune system. In particular, the chronic and dysregulated activation of microglia – the resident innate immune cells within the mature brain and spinal cord – might drive persistent CNS inflammation and contribute to disease progression. However, the stimulus (or stimuli) that initiates and maintains inflammatory processes as well as the chronic inducers of microglial cell activation are still a matter of debate. Increasing evidence exists for a role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in MS. These molecules are normally present inside all cells, but are able to cause sterile inflammation when released into the extracellular milieu by damaged or dead/dying cells. Therefore, we wondered whether DAMPs could contribute to the establishment and maintenance of inflammatory processes in MS, and to the chronic and dysregulated activation of microglia.

To address these questions, free mitochondrial (mt) DNA and several pro-inflammatory molecules were quantified in plasma samples from patients with progressive forms of MS, and correlated with demographic/clinical parameters. Then, the effects on microglia activation of DAMPs arising from mt components (MTDs) were characterized *in vitro*, using a microglial cell line of human origin as experimental model (HMC3 cells). Besides mtDNA, the effects of N-formyl peptides and cardiolipin (CL) were

analyzed on the expression of genes involved in microglia activation and on the up-regulation of markers of activation on the cell surface, together with the production of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS).

RESULTS

Seventy-three untreated, progressive MS patients – 38 with the secondary progressive (SP) form and 35 with the primary progressive (PP) form – and 42 healthy subjects (CTR) were enrolled in this study. Concerning DAMPs, circulating mtDNA was higher in SP patients than PP patients, while HMGB1 (a protein playing a role in several cellular processes, including inflammation and cell differentiation) levels did not vary between progressive patients and CTR or between SP and PP patients. This observation could indicate that the implication of free mtDNA in inflammation is associated to a chronic stage, possibly peculiar of SP form. Considering pro-inflammatory cytokines, in PP patients plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-8 were higher compared to CTR or compared to both SP patients and CTR, respectively, while all progressive patients had increased concentrations of IL-6 and IL-1 β than CTR. In addition, interferon- γ levels showed trends towards increased expression in PP patients than in SP patients and CTR, as well as in SP patients than CTR. These results highlight the imbalanced cytokine network that exists in progressive patients and that likely modulates disease activity and progression, and suggest the possibility to develop agents targeting cytokines or their receptors as novel therapies for MS. When

correlating experimental data with demographic/clinical parameters, in PP patients' plasma levels of TNF- α directly correlated with MS Severity Score.

With respect to microglia activation *in vitro*, we found that the MTDs mtDNA and CL did not up-regulate the levels of genes involved in pro-inflammatory activation nor the expression of HLA-DR and pro-inflammatory cytokines in human microglia, even if they stimulated a slight increase in cellular oxidative stress, but not in mt superoxide anion production. Conversely, N-formyl peptides increased the expression of some genes involved in microglial activation pathways, despite no changes were detected when assessing HLA-DR expression and pro-inflammatory cytokines release, along with ROS production. This could suggest a role for mtDNA and CL in the balance between pro- and

anti-inflammatory functions of microglia and, therefore, in the endogenous regulation of neuroinflammation.

CONCLUSIONS

Overall, our data indicate that in progressive MS increased plasma levels of the MTD free mtDNA, in synergy with pro-inflammatory cytokines, likely contribute to the systemic inflammatory status of these patients, though the inflammatory component could be differently activated in the two progressive forms of the disease. Moreover, this study broadens the knowledge of stimuli regulating microglial activation, and sheds light on the possibility of selectively targeting microglia by modulating its functionality through MTDs as a potential treatment strategy for MS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Nasi M, Bianchini E, De Biasi S, Gibellini L, Neroni A, Mattioli M, Pinti M, Iannone A, Mattioli AV, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A. Increased plasma levels of mitochondrial DNA and pro-inflammatory cytokines in patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020 Jan 15;338:577107
- Bianchini E, Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Neroni A, Mattioli M, Pinti M, Lo Tartaro D, Borella R, De Gaetano A, Mattioli AV, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A. Mitochondrial damage-associated molecular patterns stimulate reactive oxygen species production in human microglia. Submitted to *Molecular and Cellular Neuroscience*
- Nasi M, Bianchini E, De Biasi S, Gibellini L, Neroni A, Mattioli M, Pinti M, Iannone A, Simone AM, Sola P, Ferraro D, Vitetta F, Cossarizza A. Circulating mitochondrial DAMPs in multiple sclerosis patients and their effects on microglial cells. II Joint Meeting of the German Society for Immunology (DGfI) and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA), Munich, 10-13/09/2019

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2017 per il periodo di un anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Studio dei meccanismi immunopatologici in tessuto cerebrale donato da persone con sclerosi multipla: focus su linfociti T citotossici EBV-specifici, cellule NK e risposta all'IFN-gamma



Barbara Serafini

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Barbara Rosicarelli, Caterina Veroni, Francesca Aloisi, Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Corrado Fagnani, Centro per le Scienze Comportamentali e la Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

PREMESSE E OBIETTIVI

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un herpesvirus molto comune, che stabilisce una infezione latente nei linfociti B e mostra una forte associazione con la sclerosi multipla (SM). Tuttavia, i meccanismi che legano l'infezione con EBV alla SM sono dibattuti. In studi precedenti abbiamo rilevato la presenza del virus nel tessuto cerebrale di persone con SM, sia in forma latente che in riattivazione. Abbiamo inoltre mostrato che i linfociti T CD8 citotossici, cellule del sistema immunitario deputate a eliminare le cellule infettate dai virus, predominano nel cervello delle persone con SM ed entrano in contatto con i linfociti B infettati con EBV, sia nelle lesioni che nelle meningi.

Questi dati suggeriscono che infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione siano causate dal tentativo del sistema immunitario di eliminare EBV dal sistema nervoso centrale (SNC). Per convalidare questo modello patogenetico ci siamo posti le seguenti domande: 1) i linfociti T CD8 che riconoscono EBV migrano nel SNC? Se presenti, mostrano segni di attivazione e contattano i linfociti B infettati? 2) Le cellule natural killer (NK), che contrastano la replicazione virale, sono presenti nei siti di riattivazione intracerebrale di EBV? 3) In che modo le cellule immunitarie richiamate nel SNC e responsabili dell'infiammazione contribuiscono all'attivazione della microglia, i macrofagi residenti del SNC implicati nella demielinizzazione? L'IFN γ prodotto dai linfociti T attivati è coinvolto in questo processo?

RISULTATI

Lo studio è stato condotto su tessuto cerebrale post-mortem donato da persone con SM e fornito dalla Banca di Tessuti di SM dell'Imperial College (Londra) finanziata dalla UK MS Society. Utilizzando una tecnica che permette di identificare i linfociti T CD8 diretti contro EBV (tecnica dei pentameri) abbiamo osservato che linfociti T CD8 specifici per proteine espresse nella fase di latenza e di riattivazione del virus sono presenti nelle lesioni e nelle meningi, sono citotossici (ovvero equipaggiati per eliminare le cellule infettate) e aderiscono ai linfociti B infettati con EBV, suggerendo quindi il riconoscimento in situ degli antigeni bersaglio. Linfociti T CD8 specifici per EBV sono stati osservati nel tessuto cerebrale di 11 su 12 donatori con SM, rappresentando in alcuni casi fino al 10-20% dei linfociti T CD8 infiltranti. Linfociti T CD8 diretti contro altri virus comuni (citomegalovirus, virus dell'influenza A) o un presunto autoantigene (proteina basica della mielina) erano rari o assenti. Negli stessi tessuti le cellule NK sono state osservate solo occasionalmente.

Per valutare l'impatto di fattori solubili rilasciati dalla componente immunitaria periferica sulla microglia, abbiamo isolato il tessuto cerebrale adiacente alle cellule immunitarie infiltranti il SNC mediante microdissezione laser e determinato i cambiamenti nell'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione e nell'attivazione microgliale. I dati ottenuti suggeriscono che l'attivazione di una classica risposta antimicrobica indotta da IFN γ precede la demielinizzazione. È stata documentata l'ulteriore stimolazione di geni che codificano molecole con attività

pro-infiammatoria e pro-ossidante, estremamente dannose per le cellule del SNC, nelle lesioni attivamente demielinizzanti e ai bordi delle lesioni croniche in espansione. Lo studio ha anche messo in luce la duplice funzione della microglia, dannosa e protettiva, indicando che l'entità del danno dipende dal bilanciamento tra fattori che promuovono e limitano l'infiammazione.

CONCLUSIONI

I risultati del progetto contribuiscono a fare luce sulle componenti del sistema immunitario coinvolte nel processo infiammatorio e degenerativo nella SM. I risultati ottenuti suggeriscono che EBV sia lo stimolo scatenante di una cascata infiammatoria che coinvolge il reclutamento e la riattivazione di linfociti T CD8 diretti contro il virus presente nel SNC, e il conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie che provocano l'attivazione incontrollata della microglia e il danno del tessuto circostante. Questi risultati contribuiscono ad aumentare la conoscenza dei meccanismi di malattia e forniscono un razionale per il meccanismo d'azione dei farmaci approvati, lo sviluppo di nuovi trattamenti e la ricerca di biomarcatori di malattia nell'ambito delle interazioni tra sistema immunitario ed EBV. Un modello di SM basato sulla risposta immunopatologica indotta da EBV è compatibile con l'efficacia degli anticorpi monoclonali anti-CD20, in quanto l'eliminazione dei linfociti B, il principale *reservoir* di EBV, ridurrebbe la quantità di virus limitando la capacità distruttiva della risposta antivirale. In questa ottica, farmaci antivirali attivi su EBV potrebbero essere efficaci nella SM. Si auspica che i risultati di questo progetto stimolino ricerche su nuovi farmaci capaci di normalizzare l'interazione EBV-sistema immunitario nella SM, e la pianificazione di strategie di prevenzione per ridurre il rischio di sviluppare la SM.

Study of immunopathological mechanisms in the multiple sclerosis brain: focus on Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes, NK cells and response to IFN-gamma

INTRODUCTION AND AIMS

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous B-lymphotropic herpesvirus that is strongly associated with multiple sclerosis (MS). However, the mechanisms linking EBV infection to MS pathology are debated. In our previous studies we provided evidence for an active EBV infection in the brain of persons with MS; we also showed that cytotoxic CD8+ T cells - the immune cells that kill virus-infected cells and predominate in the MS brain - interact with EBV-infected B cells accumulating in brain lesions and within structures resembling lymph nodes - so called ectopic B-cell follicles - in the meninges. These findings led us to propose that chronic neuroinflammation resulting in central nervous system (CNS) tissue damage in MS might be driven by the host's immune system attempt to get rid of a dysregulated, intracerebrally sequestered EBV infection. Our project was designed to corroborate this immunopathological model of MS by answering the following questions: 1) do EBV-specific CD8 T cells accumulate in the MS brain and, if present, are they activated and in contact with EBV-infected B cells? 2) do NK cells, an immune cell subset with a key role in counteracting EBV lytic infection, accumulate at sites of EBV reactivation in the MS brain? 3) how CNS-infiltrating immune cells, particularly CD8 T

cells, contribute to the activation of microglia, the CNS intrinsic macrophages involved in myelin destruction? does IFN γ produced by activated T lymphocytes play a major role in microglia activation?

RESULTS

This study was performed in post-mortem brain tissues that were donated by persons with MS and were supplied by the MS Tissue Bank at Imperial College London funded by the UK MS Society. Using a technique that allows to identify CD8 T cells recognizing specific EBV proteins (the pentamer technique), we have demonstrated that CD8 T cells directed toward EBV latent and lytic proteins are present in MS lesions and in the meninges, are cytotoxic (that is equipped to kill infected cells) and stick to CNS-infiltrating EBV infected cells suggesting in situ recognition of their target antigens. EBV-specific CD8 T cells were observed in brain sections from 11 out of 12 MS donors, accounting for up to 10-20% of total brain-infiltrating CD8 T cells in some donors. CD8 T cells recognizing other common viruses, such as cytomegalovirus or influenza A virus, or the putative MS autoantigen myelin basic protein, were very rare or undetectable, suggesting active intracerebral recruitment of EBV-specific CD8 T cells. In the same MS

brain sample cohort, NK cells were rarely observed. To evaluate the impact of soluble factors released by the peripheral immune component on microglia, we isolated the brain tissue immediately adjacent to CNS-infiltrating immune cells using laser capture microdissection and assessed changes in the expression of genes playing a role in inflammation and microglia/macrophage activation. The data obtained indicate that a classical IFN γ -induced, antimicrobial macrophage response is stimulated already in the absence of evident myelin damage. Further induction of genes encoding pro-inflammatory and pro-oxidant molecules, that are highly detrimental for CNS cells, occurs in actively demyelinating lesions and at the border of chronic active lesions. The study also highlighted the dichotomous function of microglia - detrimental and protective - during CNS inflammation, indicating that the balance between dysregulated inflammation and healing responses determines the extent of CNS tissue damage.

CONCLUSIONS

The results of this project shed new light on the immune 'culprits' responsible for dysregulated inflammation resulting in demyelination and neurodegeneration in MS. It is

proposed that EBV is the initial trigger of an inflammatory cascade that involves recruitment and reactivation of virus-specific CD8 T cells upon interaction with EBV infected cells within the CNS, and subsequent release of inflammatory cytokines that lead to uncontrolled microglia activation and bystander tissue damage. These results not only advance our knowledge of MS disease mechanisms but also offer a rationale for current and future treatments and for the search of robust disease biomarkers within the EBV-host immune system interaction. An EBV-driven immunopathological model of MS is compatible with the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies, as depletion of B cells, the main EBV *reservoir*, could lower the viral load and hence the burden of the associated immunopathological response. If EBV is the main antigenic stimulus inciting and perpetuating neuroinflammation in MS, it should be possible to ameliorate MS with antiviral drugs. It is therefore hoped that the results of this project will foster the discovery of drugs able to normalize the EBV-host interaction, thereby protecting susceptible subjects, and will promote the implementation of effective preventative strategies that will reduce the risk of developing MS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Serafini B, Zandee S, Rosicarelli B, Scorsi E, Veroni C, Larochelle C, D'Alfonso S, Prat A, Aloisi F. Epstein-Barr virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome as possible cause of fulminant multiple sclerosis relapse after natalizumab interruption. *J Neuroimmunol.* 2018;319:9-12
- Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Mazzola GA, Aloisi F. Epstein-Barr Virus-Specific CD8 T Cells Selectively Infiltrate the Brain in Multiple Sclerosis and Interact Locally with Virus-Infected Cells: Clue for a Virus-Driven Immunopathological Mechanism. *J Virol.* 2019; 93(24). pii: e00980-19. doi: 10.1128/JVI.00980-19
- Serafini B, Rosicarelli B, Aloisi F. Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells infiltrate the multiple sclerosis brain. 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Berlin, 10-12 October 2018
- Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Aloisi F. Cytotoxic CD8 T cells (the effectors) against EBV-infected B cells (the targets): clues for virus-driven immunopathology in multiple sclerosis. 27th Annual Meeting of the European Charcot Foundation, Baveno, November 21st-23rd 2019

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per 2 anni (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 100.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for 2 years (extended by 10 months) and the amount of € 100,000

Valutazione dell'impatto delle terapie immunomodulatorie su pazienti SMRR tramite lo studio del repertorio TCR con tecniche di next generation sequencing



Clara Ballerini

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "DMSC", Università degli Studi di Firenze, Firenze

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Roberta Amoriello, Alberto Carnasciali, Elena Bonechi, Alessandra Aldinucci

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Victor Greiff, *Department of Immunology, University of Oslo, Norway*

Benedetta Peruzzi, *Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Centro Diagnostico di Citofluorimetria e Immunoterapia, Firenze*

Anna Maria Repice, Alice Mariottini, Luca Massacesi, *Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università degli Studi di Firenze, Firenze*

Riccardo Saccardi, *Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, SODc Terapie Cellulari e Medicina TrASFusionale, Firenze*

Benedetta Mazzanti, *Dipartimento DMSC, Università degli Studi di Firenze, Firenze*

PREMESSE E OBIETTIVI

I geni che codificano per i recettori dei linfociti (TCR e BCR) sono un caso unico nella biologia dell'uomo e tramite l'arrangiamento casuale del DNA genomico nella singola cellula, costituiscono la base del riconoscimento antigenico da parte del sistema immunitario. I progressi tecnologici recenti, come il sequenziamento di nuova generazione (NGS), hanno radicalmente rinnovato il modo di studiare il repertorio TCR e la sua dinamica in individui sani e malati. Obiettivo principale di questo studio è stato la valutazione tramite queste tecniche della variazione, in termini qualitativi e quantitativi, longitudinale (0- 24 mesi) del repertorio TCR in sottopopolazioni di linfociti T circolanti in 15 persone con sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR) durante due approcci terapeutici tra i più efficaci attualmente disponibili (l'anticorpo monoclonale anti-VLA4 natalizumab, NTZ, e il trapianto autologo con cellule staminali ematopoietiche, AHSCT). In questo modo, abbiamo ottenuto quella che per adesso è la più ampia collezione di dati circa il repertorio TCR di persone con SM sotto tera-

pia (180 repertori). Il nostro obiettivo successivo, grazie a una complessa analisi statistica multidimensionale, è stato di vedere se fosse possibile mostrare che la variabilità dei repertori TCR dipende dal trattamento e che potrebbe essere rilevante per futuri trial clinici, per la diagnosi, il monitoraggio e la personalizzazione del follow-up e del regime di trattamento di pazienti SM. Sappiamo che l'esatto ruolo funzionale associato a ogni sequenza TCR non è determinabile tramite studi puramente molecolari come il nostro. Un metodo per trarre informazioni circa il possibile riconoscimento antigenico da parte di specifiche sequenze del TCR può essere quello di confrontarsi con i database costruiti su cloni specifici o su singole cellule di cui è noto il ruolo funzionale. Questi database sono in continua crescita e nel futuro, se integrati con altre informazioni, come la tipizzazione HLA, potranno essere lo strumento di confronto fra sequenze pubbliche, sequenze private e specificità. Nel nostro campione, dopo un confronto con i principali database, abbiamo trovato perlopiù sequenze associate con la risposta virale, più che con la

SM o altre malattie autoimmuni. Obiettivo futuro sarà la valutazione delle sequenze da noi descritte e depositate, in database via via arricchiti di dati. Sempre in questa ottica, abbiamo sequenziato il gene TCR β nelle cellule T del liquido cerebrospinale (CSF) e nelle sottopopolazioni T periferiche di pazienti SM alla diagnosi. I dati CSF sono attualmente in valutazione in uno studio di meta-analisi.

RISULTATI

Da 15 persone con SM recidivante remittente (RR) (8 NTZ, 7 AHSCT) e da 4 pazienti alla diagnosi abbiamo ottenuto un database TCR di 180 campioni e oltre 50 milioni di sequenze. Per ogni NTZ abbiamo isolato linfociti CD4+ e CD8+ naïve e della memoria (effetttrici, EM, e centrali, CM). Per ogni AHSCT abbiamo isolato CD4+ e CD8+ naïve e della memoria e per ogni paziente sottoposto a puntura lombare abbiamo isolato le cellule presenti nel liquor (gruppo "CSF") e i linfociti T periferici (EM e CM). Da ogni sottopopolazione abbiamo estratto l'RNA e ne abbiamo valutato concentrazione e purezza; il sequenziamento NGS è stato effettuato con tecnologia Illumina dal servizio iRepertoire Inc. (Alabama, USA). I repertori TCR sono stati analizzati in termini quantitativi e qualitativi secondo analisi computerizzata multidimensionale. I repertori TCR nei pazienti si differenziano come segue: nei pazienti NTZ diminuisce la diversità del repertorio TCR nelle T CD8+ naïve rispetto al gruppo AHSCT a 24 mesi (t24) e, nella stessa sottopopolazione, sono presenti meno cloni pubblici (regioni condivise in almeno due soggetti) e meno cloni condivisi con i database TCR disponibili, un repertorio di fatto più privato. Anche l'analisi dello stato di espansione clonale rispetto alla prevalenza di ciascun clone è in grado di distinguere le due terapie. L'analisi di tutti i cloni presenti prima e dopo terapia in ciascun campione ha mostrato che in pazienti NTZ persistono più cloni rispetto al gruppo AHSCT. Stabilendo un valore medio di persistenza clonale in ciascun gruppo, abbiamo visto che i pazienti che si discostano dal valore medio, e quindi hanno meno persistenza nel gruppo NTZ e più persistenza nel gruppo AHSCT, sono quelli che hanno ricaduta di malattia durante la terapia. È interessante notare che il paziente del gruppo AHSCT che conserva molti più cloni rispetto alla media del gruppo ha effettuato un regime di condizionamento parziale durante il trapianto a causa di un'infezione da K.

pneumoniae.

Una informazione utile per capire la capacità di riconoscimento antigenico da parte del TCR ci viene dallo studio della architettura del repertorio TCR, valutato in termini di connessioni fra sequenze simili ("network clonale") e di sub-sequenze. I pazienti del gruppo NTZ mostrano network limitate, e cioè hanno un repertorio con minore diversità al suo interno. I pazienti del gruppo AHSCT hanno sub-sequenze simili, e questo indica un repertorio ampio in termini di diversità ma simile fra gli individui, probabilmente poiché tempi (il momento della nostra osservazione, t24) e modalità di ricostituzione (ambiente, terapia antibiotica, regime alimentare, per esempio) sono uguali per tutti. La comparazione fra i repertori TCR dei nostri pazienti e i database pubblici ha mostrato che la maggior parte delle sequenze condivise è classificata come associata alla risposta a virus. Nel gruppo CSF, le sequenze TCR condivise fra liquor e periferia sono più alte sia nelle CD8 che nelle CD4 EM (0.4-4.5%) rispetto alle CM. Ciò è vero per tutti i pazienti tranne uno, diagnosticato con SM primariamente progressiva, che non condivide nessuna sequenza fra il liquor e la periferia. Tali pazienti condividono poche sequenze con i database pubblici e la maggior parte sono di nuovo associate a virus; il confronto più approfondito con altri CSF in meta analisi con altri studi è in corso.

CONCLUSIONI

Abbiamo descritto il repertorio TCR di ogni paziente SMRR in uno studio prospettico di 24 mesi. Nella nostra analisi, il repertorio TCR sembra differire da paziente a paziente. Tuttavia, l'espansione clonale, la persistenza clonale, il numero di cloni pubblici e l'architettura di repertorio identificano i due gruppi di trattamento. La ricostituzione del repertorio TCR è quasi completa negli AHSCT, mentre i NTZ hanno mostrato una ricostituzione immunologica incompleta (in modo significativo nelle CD8 naïve).

Nei due gruppi di pazienti trattati, la persistenza clonale in 24 mesi sembra avere un legame con la risposta subottimale al trattamento e la persistenza clonale specifica di alcune sottopopolazioni T della memoria potrebbe contribuire, in futuro, a predire il successo del trattamento nei singoli pazienti.

Impact of successful immunomodulatory treatments in RRMS on human TCR repertoire by next generation sequencing and response to IFN-gamma

INTRODUCTION AND AIMS

The genes encoding immune-cell receptors (TCR and BCR) are unique in human biology and generate molecules by combinatorial rearrangement of genomic DNA at single cell level, laying the foundation for antigen recognition by the immune system. Recent technological advancements, e.g. high-throughput, sequencing (HTS), enabled a completely new way to investigate and compare TCR repertoire in healthy individuals, patients affected by autoimmune diseases and in patients during treatment. Our first aim was, by these new techniques, to investigate the TCR repertoire dynamics in peripheral blood T-cell subpopulations during successful treatments (the anti-VLA4 monoclonal antibody natalizumab, NTZ, and the autologous hematopoietic stem cell transplantation, AHSCT) in 15 relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients. We obtained the largest TCR β dataset of treated MS patients to date (180 repertoires) and our second aim was to analyze these data by multidimensional computational immunology, in order to show if longitudinal changes of TCR repertoires encode treatment-specific information that may be relevant for future clinical trials, diagnosis, monitoring and personalizing MS follow-up and treatment regimes. Molecular studies of TCR do not depict the exact functional role of each sequence, and this is a shared bottleneck of TCR investigations in bulk cell populations. Comparison of TCR sequences with available datasets is a possible way to associate a sequence to a specific antigen recognition, therefore our data, that are integrated by HLA typing information, have been compared with datasets listing TCR sequences and importantly will be available for future evaluation aimed to the analysis for TCR antigen-specificity in MS. To this end, we enrich our sample and sequenced TCR β in cerebrospinal fluid (CSF) T cells and peripheral blood T cell subpopulations in 4 RRMS patients at diagnosis. CSF data are currently under evaluation in a meta-analysis study.

RESULTS

From 15 patients with MS relapsing remitting (RR) (eight NTZ, seven AHSCT) and four incoming MS patients, we obtained a TCR dataset of 180 samples and up to 50 million of sequences. For NTZ, we isolated CD4/CD8 naïve, effector memory (Tem), central memory (Tcm) and CD8 terminally differentiated EM (Temra). For AHSCT, we iso-

lated CD4/CD8 naïve and memory and for each incoming MS patient underwent CSF collection ("CSF" group) we isolated peripheral Tem and Tcm and the whole T-cell population from CSF. From subpopulations, we extracted the RNA, then evaluated for concentration and purity; HTS was performed with Illumina technology by iRepertoire Inc. (Alabama, USA). We performed deep bioinformatic analyses on TCR repertoires, specifically on aminoacidic CDR3 sequences (CDR3-a.a.). We observed treatment-specific differences in the TCR repertoire of treated patients: NTZ showed a significantly reduced TCR diversity in CD8 naïve cells at T24 compared to AHSCT. CD8 naïve cells also showed a significant lower number of public clones (CDR3-a.a. shared between at least two repertoires) and less shared clones at T24 compared to AHSCT with publicly available TCR datasets. Repertoires clustered based on treatment based on the global expansion state of the TCR receptor. The analysis of clonal persistence showed a higher percentage of persistent clones in the peripheral blood of NTZ patients compared to AHSCT at T24, with exceptions: two NTZ patients who had a relapse during treatment and one AHSCT patients who received a mild conditioning regimen due to a *K. pneumoniae* infection and who then experienced a posttransplant relapse. We next evaluated TCR repertoire architecture in terms of connections between similar clones ("clone network") and sub-sequences, resulted from CDR3-a.a. decomposition in small subsequences of 3 a.a. ("k-mers", $k=3$). Results showed a higher number of similar sequences among NTZ, that therefore develop a less diverse repertoire, and a higher sub-sequence similarity among AHSCT at T24, that therefore show a wide repertoire possibly developed in a protected, similar environment. The comparison of our RRMS dataset with public TCR datasets showed that the most shared clones are with viral-associated sequences. In CSF, TCR overlapping sequences between CSF and the periphery are higher in both CD8 and CD4 EM (0.4-4.5%) compared to CM. This is true in all patients except for the one diagnosed as PPMS, that did not share any sequences with the periphery. Few sequences are shared with datasets, most of them virus associated.

CONCLUSIONS

We evaluated each patient TCR repertoires in a 24-months prospective study on RRMS patients, eight NTZ, se-

ven AHSCT. In our analysis, the TCR repertoire seem to be different from patient to patient. Even though, clonal expansion, clonal persistence, public clone number, and repertoire architecture were overall different between the two treatment groups. TCR repertoire reconstitution is almost complete in AHSCT patients whereas incomplete immune reconstitution (significant in CD8 naïve T cells)

was associated to the NTZ. Within treatment groups, clonal persistence from T0 to T24 seems to have a relationship with suboptimal response to treatment and specific memory T-cell subpopulations clonal persistence may contribute to predict the patient outcome to treatment in the future.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Amoriello R, Greiff V, Aldinucci A, Bonechi E, Carnasciali A, Peruzzi B, Repice AM, Mariottini A, Saccardi R, Mazzanti B, Massacesi L, Ballerini C The TCR repertoire reconstitution in multiple sclerosis: comparing one-shot and continuous immunosuppressive therapies. *Frontiers Immunology* 2020 March DOI: 10.3389/fimmu.2020.00559
- Amoriello R, Greiff V, Lossius A, Carnasciali A, Mariottini A, Ballerini C. Meta-analysis of CSF TCR repertoire sequencing data in multiple sclerosis patients; in preparation
- Anti VLA4 integrin treatment shapes T cell repertoire in Multiple Sclerosis: a 24 months' study. Poster presentation. XXVI AINI congress 16th ESNI Course, June 26-30th 2017, San Servolo, Venice, Italy
- Effective treatments in RRMS shape mostly the CD8+ T cell receptor repertoire. Poster presentation. XXVII AINI congress, May 7-8th 2018, Trieste, Italy
- TCR repertoire dynamics are tuned by RRMS treatments. Poster presentation. 45th General Meeting of the Scandinavian Society for Immunology (SSI) & 30th Spring School of Immunology, April 2-6th 2019, Geilo, Norway
- TCR repertoire dynamics is tuned by treatments in RRMS. Platform presentation. XXVIII AINI Congress, May 6-9th, Camogli, Genoa, Italy
- The TCR repertoire reconstitution in multiple sclerosis: comparing one-shot and continuous immunosuppressive treatments. Seminar for "Young" section of DENOTHE center of University of Florence, September 25th, Florence, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 155.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 12 months) and the amount of € 155,000

Meccanismi molecolari della funzione protettiva del TNFR2 oligodendrogliale: un nuovo target terapeutico nelle patologie neuroimmuni



Roberta Brambilla

The Miami Project To Cure Paralysis, Department of Neurological Surgery, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Haritha L. Desu, Placido Illiano, Melanie J. Plastini, Yoleinni Florimon, Pernille M. Madsen, Minna Yli-Karjanmaa, Shwetha Mudalegundi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Kate L. Lambertsen, Bettina H. Clausen, *Department of Neurobiology Research, Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark*

PREMESSE E OBIETTIVI

Il Tumor Necrosis Factor (TNF) è un fattore multifunzionale coinvolto nella fisiopatologia della sclerosi multipla (SM). Il TNF esiste in due forme attive, solubile (solTNF) e di membrana (tmTNF), che agiscono attraverso l'attivazione dei recettori TNF receptor 1 (TNFR1) e TNF receptor 2 (TNFR2). Il solTNF preferenzialmente si lega e attiva il TNFR1, mentre il tmTNF, che si lega a entrambi i recettori, è il principale attivatore del TNFR2. In stati patologici il TNFR1 attiva processi di morte cellulare e infiammazione cronica, e il TNFR2 sostiene processi di sopravvivenza e riparazione cellulare. Il nostro gruppo di ricerca ha contribuito significativamente alla delucidazione delle funzioni del TNF nelle condizioni autoimmuni del sistema nervoso centrale (SNC) usando il modello dell'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), un modello di SM. Abbiamo dimostrato che il signaling del tmTNF-TNFR2 nelle cellule gliali, in particolare oligodendrociti e microglia, attiva processi protettivi e di riparazione. Infatti, topi transgenici con ablazione di TNFR2 dall'intero lignaggio oligodendrocitario (CNP-cre:TNFR2^{fl/fl}) mostrano un peggioramento dell'ESA. Questo decorso è associato, in cronico, a un aumento del danno assonale e alla mielina e a una riduzione della rimielinizzazione (Madsen et al., 2016) e, in acuto, a un aumento della neuroinfiammazione. In questo progetto di ricerca il nostro scopo è di identificare i meccanismi molecolari alla base del ruolo protettivo del TNFR2 oligodendrogliale, focalizzandoci in particolare sui precursori oligodendrocitari (PO).

La nostra ipotesi è che il TNFR2 nei PO regola cascate cellulari coinvolte nel differenziamento, quindi nella capacità di mielinare e rimielinare, e nella produzione di fattori

immunomodulatori. Per testare questa ipotesi ci siamo avvalsi di topi transgenici generati nel nostro laboratorio (topi PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{fl/fl}) in cui i PO sono privi di TNFR2 e al tempo stesso esprimono la enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). Per valutare il ruolo di TNFR2 nel differenziamento abbiamo impiegato il modello di demielinizzazione da cuprizone, mentre per studiarne il ruolo immunomodulatorio abbiamo impiegato il modello di ESA con MOG₃₅₋₅₅.

RISULTATI

Usando il modello di ESA abbiamo dimostrato che l'ablazione del TNFR2 nei PO (topi PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{fl/fl}) causa un'insorgenza e un picco precoce della malattia. Tale effetto è associato a un'infiltrazione anticipata di linfociti T CD4⁺, neutrofilo, natural killers e macrofagi attivati nel midollo spinale, e a un aumento significativo del numero di cellule microgliali attivate.

Questo indica che il TNFR2 nei PO ha un ruolo importante nel modulare il reclutamento delle cellule immunitarie dalla periferia all'interno del SNC, così come nella risposta immunitaria innata del SNC, controllando l'insorgenza della malattia. Per testare l'ipotesi che ciò sia dipendente da un effetto diretto del TNFR2 sulla capacità dei PO di produrre molecole immunomodulatorie (ad esempio citochine e chemochine), abbiamo condotto esperimenti *in vitro* su colture primarie di PO ottenuti da topi wild type (WT) o con ablazione di TNFR2. Al seguito di esposizione a stimolo infiammatorio (TNF/IL1 β /IFN γ), abbiamo analizzato il profilo di espressione genica dei PO tramite RNA-sequencing, trovando oltre 3.000 geni alterati nei PO ablati di TNFR2

rispetto ai WT, molti dei quali coinvolti in processi immunomodulatori e infiammatori a conferma della nostra ipotesi. Usando il modello del cuprizone abbiamo determinato che l'ablazione del TNFR2 nei PO causa una riduzione del differenziamento dei PO nel corpo calloso sei settimane dopo la sospensione del cuprizone, durante il periodo di rimielinizzazione spontanea. Infatti, il numero di oligodendrociti maturi positivi per GST π^+ è risultato ridotto nei topi PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{f/f}, indicando che il TNFR2 è direttamente implicato nel processo di differenziamento. Questo è accompagnato da un aumento nel numero di cellule microgliali, indicando che il ridotto differenziamento dei PO può dipendere anche da un effetto indiretto del TNFR2 sulla funzione immunitaria innata del SNC.

CONCLUSIONI

I nostri dati indicano che il TNFR2 espresso dai PO esplica funzioni protettive nelle condizioni autoimmuni del SNC attraverso la modulazione di due processi distinti: 1) il contenimento della capacità dei PO di produrre fattori immunomodulatori e infiammatori; 2) l'aumento della capacità dei PO di differenziare in oligodendrociti mielinanti maturi. Poiché entrambi i processi hanno funzioni chiave nella patogenesi della SM così come nei processi di riparazione del SNC, lo sviluppo di strategie per attivare il signaling del TNFR2 ad hoc durante il corso della malattia potrebbe rappresentare un efficace duplice approccio per il trattamento della SM.

Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuro-immune disease

INTRODUCTION AND AIMS

The pleiotropic cytokine tumor necrosis factor (TNF) is involved in the pathophysiology of multiple sclerosis (MS). TNF exists in two active forms, transmembrane (tmTNF) and soluble (solTNF), whose functions are mediated by TNF receptor 1 (TNFR1) and TNF receptor 2 (TNFR2). SolTNF preferentially binds to and activates TNFR1, whereas tmTNF, which binds to both receptors, is the main activating ligand of TNFR2. During disease, TNFR1 generally initiates cell death and chronic inflammatory mechanisms, while TNFR2 mainly initiates pro-survival and reparative cascades.

Our group has significantly contributed to elucidating the function of TNF in central nervous system (CNS) autoimmunity using the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. We demonstrated that tmTNF-TNFR2 signaling in glial cells, specifically oligodendrocytes and microglia, drives protective and reparative processes. Indeed, by ablating TNFR2 from all oligodendrocyte lineage cells in CNP-cre:TNFR2^{f/f} transgenic mice, we showed that lack of oligodendroglial TNFR2 leads to EAE exacerbation. Chronically, this outcome is associated with increased axon and myelin damage and reduced remyelination (Madsen et al., 2016) and, acutely, with increased neuroinflammation. In this research project we sought to further elucidate the molecular mechanisms at the basis of oligodendroglial TNFR2 protective functions, focusing specifically on oligodendrocyte precursor cells (OPCs).

Our hypothesis is that TNFR2 in OPCs regulates signaling cascades involved in their capacity to differentiate, thus myelinate/remyelinate, as well as to produce immunomodulatory molecules. We tested this hypothesis with a transgenic mouse model generated in our lab (PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{f/f} mice) where OPCs are ablated of TNFR2 and con-

comitantly express enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). To evaluate the role of TNFR2 in OPC differentiation we used the cuprizone model of demyelination, whereas to dissect its immunomodulatory function we used the MOG₃₅₋₅₅ EAE model.

RESULTS

Using the EAE model of MS we demonstrated that ablation of TNFR2 in OPCs (PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{f/f} mice) resulted in earlier onset and peak of disease. This was associated with accelerated infiltration of CD4⁺ T cells, neutrophils, natural killers and activated macrophages in the spinal cord, as well as significant increase in the number of activated microglia. These data indicate that TNFR2 signaling in OPCs plays a role in modulating the trafficking of peripheral immune cells into the CNS, as well as the CNS innate immune response, thus controlling the onset of disease. To assess the hypothesis that this could be due to a direct effect of TNFR2 on OPCs' capacity to produce immunomodulatory molecules (e.g., cytokines and chemokines), we conducted an *in vitro* study on primary OPC cultures obtained from wild type (WT) and TNFR2 knockout (KO) mice. After exposure to proinflammatory stimuli (TNF/IL1 β /IFN γ), OPCs' gene expression was profiled by RNA-sequencing revealing differential expression of over 3,000 genes between TNFR2 KO and WT OPCs, many involved in immunomodulation and inflammation, thus supporting our hypothesis.

Using the cuprizone model of demyelination we determined that ablation of TNFR2 in OPCs resulted in reduced OPC differentiation in the corpus callosum six weeks after termination of cuprizone exposure, during the phase of spontaneous remyelination. Indeed, the number of newly formed GST π^+ myelinating oligodendrocytes was significantly reduced in

PDGFR α -cre^{ERT2}:EYFP:TNFR2^{fl/fl} mice indicating that TNFR2 is directly implicated in the process of oligodendrocyte differentiation. This was accompanied by a significant increase in the number of microglia, suggesting that the impaired differentiation could also be dependent on an indirect effect of TNFR2 on CNS innate immunity.

CONCLUSIONS

Our data indicate that TNFR2 expressed by OPCs exerts

protective functions in neuroimmune disease through the modulation of two distinct processes: 1) containing the ability of OPCs to produce immunomodulatory and inflammatory factors, and 2) increasing the capacity of OPCs to differentiate into mature myelinating oligodendrocytes. Since both these processes play key roles in MS pathogenesis as well as CNS repair, developing strategies to enhance TNFR2 signaling *ad hoc* during the course of the disease may represent an effective two pronged approach for MS therapy.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS Journal*, in press
- Madsen PM, Desu HL, De Rivero Vaccari JP, Florimon Y, Ellman D.G, Keane RW, Clausen BH, Lambertsen KL, Brambilla R. Oligodendrocytes modulate the immune-inflammatory response in EAE via TNFR2 signaling. *Brain Behav Immun*. 2019 Nov 27. pii: S0889-1591(19)30796-2
- Brambilla R. Neuroinflammation, the thread connecting neurological disease. Cluster: "Neuroinflammatory mechanisms in neurodegenerative disorders". *Acta Neuropathol*. 2019, 137:689-691
- Brambilla R (2019) The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol*. 2019 137(5):757-783
- Yli-Karjanmaa M, Clausen BH, Degn M, Novrup HG, Ellman DG, Szymkowski DE, Meyer M, Brambilla R, Lambertsen KL) Topical administration of a soluble TNF inhibitor reduces infarct volume after focal cerebral ischemia in mice. *Front Neurosci*. 2019, 13:781
- Al-Ali H, Gao H, Dalby-Hansen C, Peters VA, Shi Y, Brambilla R. High content analysis of phagocytic activity and cell morphology with PuntoMorph. *J Neurosci Methods*. 2017 Nov 1;291:43-50
- Desu HL, Illiano PI, Florimon Y, Plastini MJ, Madsen PM, Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 regulates neuroinflammation and remyelination following CNS disease. The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 10-13, 2019, Porto, Portugal
- Illiano PI, Haritha Desu HL, Plastini MJ, Mudalegundi S, Moosa MM, Yli-Karjanmaa M, Brambilla R. Astroglial TNFR2 signaling is implicated in the regulation of learning, memory and anxiety. The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 10-13, 2019, Porto, Portugal
- Illiano PI, Haritha Desu HL, Plastini MJ, Mudalegundi S, Moosa MM, Yli-Karjanmaa M, Brambilla R. Astroglial TNFR2 signaling is implicated in the regulation of learning, memory and anxiety. The 17th TNF conference, June 3-7, 2019, Asilomar, Monterey, CA
- Desu HL, Illiano PI, Florimon Y, Plastini MJ, Madsen PM, Brambilla R. Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuroimmune disease. Congresso Scientifico Annuale FISM, May 2019, Rome, Italy
- Plastini MJ, Madsen PM, Desu HL, Illiano PI, Moraes CT, Brambilla R. Role of mitochondrial dysfunction in oligodendrocytes in the etiopathogenesis of multiple sclerosis. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 3-7, 2018, San Diego, CA
- Desu HL, Madsen PM, Illiano PI, Plastini MJ, Shi J, Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 regulates neuroinflammation and remyelination following CNS disease. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 3-7, 2018, San Diego, CA
- Illiano PI, Haritha Desu HL, Plastini MJ, Mudalegundi S, Moosa MM, Yli-Karjanmaa M, Brambilla R. Role of astroglial TNFR2 in cognition, memory and anxiety. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 3-7, 2018, San Diego, CA
- Desu HL, Illiano PI, Madsen PM, Brambilla R. Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuroimmune disease. Congresso Scientifico Annuale FISM, May 2018, Rome, Italy
- Yli-Karjanmaa M, Clausen BH, Novrup HG, Szymkowski D, Meyer M, Brambilla R, Lambertsen KL. Topical administration of TNF-inhibitor XPro1595 decreases infarct volume after experimental stroke. The XIII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, July 8-11, 2017, Edinburgh, Scotland
- Madsen PM, Illiano P, Peters VA, de Rivero Vaccari JP, Ellman DG, Keane RW, Lambertsen KL, Brambilla R. Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuroimmune disease. Congresso Scientifico Annuale FISM, May 2017, Rome, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 161.000 €
Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 3 years and the amount of € 161,000

Possibili effetti divergenti di microglia e macrofagi sui precursori degli oligodendrociti: ruolo delle vescicole extracellulari



Martina Gabrielli

CNR Istituto di Neuroscienze, Milano

MENTORE/MENTOR
Claudia Verderio

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule maggiormente colpite nella sclerosi multipla (SM) sono gli oligodendrociti e i loro precursori (precursori degli oligodendrociti, OPC), cellule responsabili della deposizione della guaina mielinica attorno agli assoni neuronali e protagoniste dei processi di riparo in caso di lesione alla mielina. La microglia (MG) residente nel cervello e i macrofagi (MF) provenienti dalla circolazione periferica sono tra le cellule effettrici della risposta infiammatoria associata alla SM, che a sua volta limita il riparo della mielina (rimielinizzazione).

Precedenti studi hanno evidenziato come la produzione di vescicole extracellulari (VE) da parte di cellule mieloidi, come la MG e i MF infiltrati, correli con i periodi ad alta sintomatologia nel modello sperimentale murino di SM (Encefalite Sperimentale Autoimmune, ESA) e come, al contrario, la ESA migliori in topi in cui il rilascio di VE è compromesso. Questi dati dunque suggeriscono che le VE rilasciate da MG e/o MF possano essere responsabili dei deficit di rimielinizzazione tipici della patologia. D'altra parte, MF e MG possono rilasciare anche fattori protettivi all'interno di VE e l'impatto delle VE da MG/MF sugli OPC può variare a seconda dello stato di attivazione della cellula madre. In accordo con questi dati, uno studio recentemente pubblicato dal laboratorio in cui lavoro ha mostrato come le VE da MG agiscano sempre in modo benefico, se si valutano gli effetti diretti sulla migrazione, il differenziamento e la capacità di deporre mielina degli OPC, anche quando le VE sono rilasciate da cellule pro-infiammatorie. Ciò suggerisce che le VE rilasciate da MF, piuttosto che dalla MG, siano responsabili del blocco della rimielinizzazione nei topi ESA.

Al fine di verificare questa ipotesi, ho valutato gli effetti di VE da MF sulla migrazione, il differenziamento e la capacità di deporre mielina degli OPC, confrontandoli con quelli delle VE da MG.

RISULTATI

Come prima cosa, ho messo a punto un protocollo per ottenere colture molto pure di MF da midollo osseo di ratto. Ho poi polarizzato i MF verso un fenotipo pro-infiammatorio o pro-rigenerativo, o alternativamente li ho co-coltivati con cellule staminali mesenchimali. Il fenotipo acquisito dai MF è stato verificato mediante PCR quantitativa per noti marcatori di polarizzazione. Gli effetti delle VE rilasciate da MF in diversi stati di attivazione sulla migrazione degli OPC sono stati testati tramite un classico saggio di chemoattrazione in transwell. La quantificazione degli OPC in grado di migrare ha rivelato che le VE rilasciate da MF non sono mai in grado di attrarre gli OPC, indipendentemente dal loro stato di attivazione, contrariamente alle VE rilasciate da MG che promuovono sempre la loro migrazione. Successivamente, ho effettuato un'analisi immunocitochimica per il marcatore di oligodendrociti maturi MBP, su OPC mantenuti in condizioni di coltura differenzianti, in presenza di VE da MF in diversi stati di attivazione. Questa analisi ha rivelato che le VE di origine macrofagica, al contrario delle VE microgliali, non sono in grado di promuovere il differenziamento degli OPC e che le VE rilasciate da MF pro-infiammatorie sono in grado addirittura di inibire in maniera significativa la maturazione degli OPC a cellule mielinizzanti. Inoltre, lo studio della deposizione di mielina in OPC co-coltivati con neuroni dei gangli delle radici dorsali (DRG) ha indicato che, contrariamente alle VE da MG, le VE da MF non promuovono la mielinizzazione.

Dal momento che gli effetti sugli OPC di VE da MF e MG sono risultati essere opposti, ho deciso di valutare le differenze molecolari tra le due popolazioni di VE tramite analisi con spettroscopia RAMAN, una tecnica ottica molto sensibile che è in grado di fornire informazioni circa la composizione chimica delle VE, al fine di approfondire i meccanismi molecolari alla base della loro diversa azione.

Questa analisi ha evidenziato una significativa differenza nella composizione delle VE macrofagiche rispetto a quelle microgliali, da ascrivere prevalentemente alla componente lipidica. Dato che gli endocannabinoidi sono già stati associati al differenziamento degli OPC, sto ora valutando la possibilità che questi lipidi possano mediare l'attività pro-differenziante delle VE da MG e che siano di fatto presenti in quantità diverse nelle due popolazioni di VE.

CONCLUSIONI

Questi risultati indicano che le VE rilasciate da MF, al contrario di quelle da MG, non hanno un'azione benefica nei confronti degli OPC. Infatti le VE da MF non promuovono mai la migrazione né il differenziamento, né favoriscono la deposizione di mielina. In particolare, le VE rilasciate

da MF attivati in senso pro-infiammatorio impattano negativamente sia sulla migrazione che sul differenziamento degli OPC. Inoltre, i miei risultati indicano che le VE rilasciate da MF hanno una diversa composizione molecolare rispetto alle VE da MG, in particolare per quanto riguarda la loro composizione lipidica. Dato che abbiamo recentemente dimostrato che le VE rilasciate a MG pro-infiammatoria hanno invece un'azione opposta (pro-mielinizzante), nel futuro mi dedicherò a studiare i componenti che sono espressi diversamente nelle VE prodotte da MG rispetto a quelle prodotte dai MF, ed in particolare il loro contenuto in endocannabinoidi.

Questi esperimenti aiuteranno a sviluppare nuovi farmaci che promuovano la riparazione delle lesioni mieliniche nella SM.

Microglia versus macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles

INTRODUCTION AND AIMS

The cell type primarily affected in multiple sclerosis (MS) are oligodendrocytes and their precursors (oligodendrocyte precursor cells, OPCs), which deposit the myelin sheath along neuronal axons and supports endogenous brain repair following a myelin lesion (remyelination). Brain resident microglia (MG) and macrophages (MP) from peripheral circulation are among the effector cells of the inflammatory response associated to MS, which limits myelin repair.

Previous data showed that the production of extracellular vesicles (EVs) from myeloid cells, MG and/or infiltrating MP, correlates with bouts of symptoms in EAE mice, an experimental mouse model of MS, while EAE ameliorates in transgenic mice impaired in EV secretion, suggesting that EVs secreted by MG and/or MP may be responsible for remyelination failure. However, reactive MG and MP also release protective factors in association to EVs depending on their activation state, and the impact of EVs derived from MP or MG on OPCs may be distinct. Accordingly, a recent study from the hosting lab revealed that microglial EVs (MG EVs), even derived from inflammatory cells, have always direct protective effects on OPC migration, differentiation and myelin deposition, suggesting that MP, rather than MG, might be responsible for the block of remyelination in EAE mice.

To test this hypothesis, I explored the direct effects of MP-derived EVs on OPC migration, differentiation, and myelin deposition, as compared to MG-derived EVs.

RESULTS

First, I optimized cell culture preparation to obtain pure MP cultures from the rat bone marrow. I polarized cultured MP towards a pro-inflammatory or a pro-regenerative activation state, or co-cultured them with mesenchymal stem cells. The acquired MP phenotypes were tested by qPCR for established polarization markers. The effects of EVs from differentially polarized MP on OPC migration were assessed by a classical transwell-based chemokinesis assay. Quantification of migrating OPCs revealed that MP EVs never attract OPCs, independently of the donor cell phenotype, while EVs derived from MG with different phenotypes always promoted OPC migration. Next, I performed immunocytochemistry analysis of the marker of mature oligodendrocytes MBP on OPCs cultured in differentiating conditions in the presence of EVs from differently activated MP. The analysis revealed that MP EVs are not able to promote OPC differentiation. Rather, EVs released by pro-inflammatory MP significantly inhibit OPC maturation into myelinating cells, as opposed to MG EVs. Moreover, analysis of myelin deposition in OPCs co-cultured with dorsal root ganglia (DRG) neurons indicated that MP EVs do not promote axon myelination, differently from MG EVs.

Given the opposite effects of EVs derived from MP or MG on OPCs, I decided to compare the molecular composition of the EVs released by MP and MG through RAMAN spectroscopy, a sensitive optical technique that provides information on the chemical content of EVs, in order to gain

insights into the molecular mechanisms underlying the differential action of the two EV populations. The analysis showed a significant difference in the composition of the two EV populations, mainly attributable to lipids.

Because endocannabinoids (eCBs) were previously implicated in OPC differentiation, I am currently investigating whether eCBs may mediate the pro-differentiating capacity of MG EVs and whether they may be differentially expressed in EVs derived from MP.

CONCLUSIONS

Collectively these results indicate that MP-derived EVs are not beneficial for OPCs. MP EVs never promote OPC migration or differentiation, nor favor myelin deposition.

In particular, EVs released from pro-inflammatory MP impair both OPC migration and differentiation, thus proving that MP EVs may negatively impact OPCs. Furthermore, my results indicate that MP EVs have a distinct molecular composition compared to MG EVs, especially in their lipid components. Given that we recently demonstrated that EVs released from proinflammatory MG have an opposite promyelinating action on OPCs, future experiments will be devoted to define which components are differentially expressed in pro-inflammatory EVs produced by MG vs MP, with particular focus on eCB content. These experiments may help in designing new therapeutics to foster myelin repair.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Lombardi M, Parolisi R, Scaroni F, Bonfanti E, Gualerzi A, Gabrielli M, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Giussani P, Viani P, Garlanda C, Abbraccio MP, Chaabane L, Buffo A, Fumagalli M, Verderio C, *Detrimental and Protective Action of Microglial Extracellular Vesicles on Myelin Lesions: Astrocyte Involvement in Remyelination Failure*, *Acta Neuropathol*, 138 (6), 987-1012, PMID: 31363836, DOI: 10.1007/s00401-019-02049-1, Dec 2019
- Verderio C, Gabrielli M, Giussani P, *Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles*, *J Lipid Res*. 2018 Aug;59(8):1325-1340. doi: 10.1194/jlr.R083915. Epub 2018 May 31.
- Lombardi M, Drago F, Prada I, Gabrielli M, Joshi P, Cojoc D, Franck J, Fournier I, Vizioli J and Verderio C, *ATP Modifies the Proteome of Extracellular Vesicles Released by Microglia and Influences Their Action on Astrocytes*, *Front Pharmacol*. 2017; 8: 910. Published online 2017 Dec 13. doi: 10.3389/fphar.2017.00910
- Gabrielli M, Scaroni F, Lombardi M, Bonfanti E, Filipello F, Fumagalli M, Verderio C, *Microglia versus Macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles*, *FISM Meeting 2019*, 29-31 maggio 2019, Rome, Italy
- Gabrielli M, Scaroni F, Lombardi M, Bonfanti E, Filipello F, Fumagalli M, Verderio C, *Microglia versus Macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles*, *II More than Neurons 2019*, 29 novembre - 1 dicembre 2018, Turin, Italy
- Gabrielli M, Scaroni F, Lombardi M, Bonfanti E, Filipello F, Fumagalli M, Verderio C, *Microglia versus Macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles*, *FISM Meeting 2018*, 28-30 maggio 2018, Rome, Italy

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 68.000 €
Research Fellowship funded by FISM Grant 2016 for the period of 2 years and the amount of € 68,000

Meccanismi di segnalazione mediati da Sox17 implicati in genesi e rigenerazione di oligodendrociti



Vittorio Gallo

Center for Neuroscience Research, Children's National Research Institute, Children's National Hospital, Washington DC, USA

COLLABORATORI/ COLLABORATORS
Xiaotian Ming, Li-Jin Chew

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS
Jeffrey Dupree, Department of Anatomy and Neurobiology, Virginia Commonwealth University Medical Center, Richmond, VA, USA

PREMESSE E OBIETTIVI

Il fattore di trascrizione Sox17 facilita la formazione di oligodendrociti che formano mielina da cellule progenitrici ed è sovraregolato nelle aree cerebrali attivamente autoriparanti dei pazienti con sclerosi multipla. La comprensione del meccanismo d'azione di Sox17 ci permetterà di sfruttare meccanismi molecolari per promuovere la riparazione della mielina. Sox17 agisce prevenendo l'azione di Wnt, che in condizioni patologiche blocca la maturazione degli oligodendrociti. Lo scopo principale di questo progetto è di definire in che modo Sox17 influenza la rigenerazione degli oligodendrociti regolando Wnt e Hedgehog nel cervello adulto. Abbiamo cercato proteine coinvolte nella produzione di oligodendrociti mediata da Sox17 usando mutanti di topo carenti di Sox17 o con iperespressione di questo fattore di trascrizione. Questi studi hanno stabilito relazioni funzionali che coinvolgono Sox17, Wnt e Hedgehog e che operano in maniera integrata per mantenere gli oligodendrociti in uno stato maturo. Infine, abbiamo cercato di utilizzare agenti chimici che modulano Hedgehog per accelerare il recupero funzionale dopo demielinizzazione in topi normali o con carenza di Sox17. Nel corso di queste analisi, abbiamo scoperto un terzo segnale - Notch - come gene bersaglio di Sox17 che potrebbe partecipare alla segnalazione mediata da Hedgehog per promuovere rigenerazione degli oligodendrociti.

RISULTATI

Abbiamo stabilito che Sox17 è necessario per la formazione di oligodendrociti durante lo sviluppo. Abbiamo eliminato geneticamente Sox17 da cellule progenitrici e oligodendrociti immaturi, e ottenuto un numero ridotto di oligodendrociti, mielina anormale e compromissione

della coordinazione motoria. Inoltre, i topi con carenza di Sox17 non riescono a sostituire gli oligodendrociti persi dopo demielinizzazione. Sox17 è anche necessario per l'espansione di oligodendrociti immaturi, che sono una fonte di oligodendrociti maturi per la riparazione. Abbiamo identificato il recettore Notch come bersaglio genetico di Sox17. Notch media l'espansione delle cellule progenitrici nello sviluppo del cervello e nel tessuto mielinico danneggiato. Nel corso dell'analisi dell'espressione genica, abbiamo trovato un altro fattore di trascrizione, TCF7L2 (bersaglio genetico di Sox17 e Notch), che è noto per il suo ruolo nella regolazione di Wnt nel controllo della differenziazione di cellule progenitrici. È possibile che il controllo da parte di Sox17 di TCF7L2 sia alla base della perdita persistente di cellule di oligodendrociti nei mutanti di Sox17 che sono incapaci di sostenere maturazione e sopravvivenza degli oligodendrociti.

La sovraespressione di Sox17 in un topo transgenico ha avuto l'effetto opposto. La segnalazione Wnt è patologicamente aumentata nelle lesioni, ma nel topo transgenico Sox17 previene la segnalazione attraverso Wnt indotta da lesione, consentendo alle cellule progenitrici di completare la maturazione ad oligodendrociti. Poiché Sox17 non regola direttamente Wnt nel cervello adulto, abbiamo cercato meccanismi indiretti. Abbiamo scoperto che Sox17 aumenta la segnalazione di Sonic Hedgehog nel cervello intatto. Usando inibizione genetica e farmacologica, abbiamo scoperto che la segnalazione di Hedgehog è necessaria per il mantenimento e la sopravvivenza degli oligodendrociti basali e funziona a monte per regolare Wnt. In topi normali, Hedgehog stimola Wnt; tuttavia quando Sox17 è sovraespresso, Hedgehog sopprime Wnt. La co-somministrazione di un attivatore di Hedgehog e di

piccole molecole nelle lesioni mieliniche migliora la rigenerazione degli oligodendrociti e sopprime Wnt indotto dalla lesione, simile alla sovraespressione di Sox17. La stimolazione di Hedgehog nei topi con deficit di Sox17 non riesce a ripristinare Hedgehog e gli oligodendrociti nelle lesioni, indicando un ruolo vitale di Sox17.

CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano che l'ablazione di Sox17 interrompe lo sviluppo post-natale degli oligodendrociti e la loro rigenerazione dopo danno alla mielina nel cervello adulto. Questo risultato è dovuto alla funzione essenziale di Sox17 nell'espansione e maturazione dei progenitori degli oligodendrociti. In secondo luogo, dimostriamo che Notch è un bersaglio dell'azione di Sox17, suggerendo

nuovi ruoli nella segnalazione durante lo sviluppo. Infine, attraverso l'analisi di un mutante murino con sovraespressione di Sox17, dimostriamo che la rigenerazione degli oligodendrociti mediata da Sox17 e la protezione della sostanza bianca si basano su una amplificazione di Hedgehog. L'aumentata segnalazione di Hedgehog attenua l'inibizione mediata da Wnt nelle lesioni della sostanza bianca, promuovendo rigenerazione degli oligodendrociti. Sebbene al momento non sia noto come Hedgehog sia aumentato da Sox17, questo fattore di trascrizione che stimola la rigenerazione e la protezione degli oligodendrociti rappresenta un bersaglio terapeutico promettente per future strategie di rimielinizzazione.

Signaling mechanisms underlying Sox17-mediated oligodendrocyte generation and repair

INTRODUCTION AND AIMS

The transcription factor Sox17 facilitates the formation of myelin-forming oligodendrocytes from progenitor cells, and is upregulated in actively self-repairing brain areas of multiple sclerosis patients. By understanding its mechanism of action, we can harness its molecular pathways to promote myelin repair. Sox17-related signaling is implicated in overcoming blocks in oligodendrocyte replacement due to pathological Wnt signaling. This project was designed to define how Sox17 effects oligodendrocyte regeneration by regulating Wnt and Hedgehog pathways in adult brain. We sought proteins involved in Sox17-mediated oligodendrocyte production by using Sox17-deficient or -overexpressing mouse mutants. These studies established functional relationships involving Sox17, Wnt and Hedgehog that operate to maintain oligodendrocytes, and which are modulated in myelin lesions. Finally, we sought to use chemical Hedgehog agents to accelerate recovery in wild-type and the Sox17-deficient mouse. In the course of these analyses, we discovered a third signal, Notch, as a target gene of Sox17, and which may participate in Hedgehog signaling by Sox17 for successful oligodendrocyte regeneration.

RESULTS

To understand Sox17-dependent cellular signaling in developing oligodendroglia, we established that endogenous Sox17 is required for oligodendrocyte formation. We genetically deleted Sox17 from immature oligodendrocyte progenitor cells and observed that adult Sox17 deficient mice had fewer oligodendrocytes and suffer from abnormal myelin and impaired motor coordination. Unlike wild type mice which showed efficient tissue repair, experimental myelin lesions in Sox17-deficient mice failed to replace oligodendrocytes lost through damage. Sox17 was required

for the expansion of immature oligodendrocyte cells, which are a source of mature oligodendrocytes for repair. We identified Notch receptor as a gene target of Sox17. Notch mediates progenitor cell expansion, not only in developing brains, but also in damaged myelin tissue. In the course of gene expression analysis, we found another transcription factor, TCF7L2, that is known to regulate Wnt signaling and to control progenitor cell differentiation, to be a gene target of both Sox17 and Notch. It is possible that Sox17 control of TCF7L2 underlies the persistent loss of oligodendrocyte cells in Sox17 mouse mutants through its inability to sustain oligodendrocyte maturation and survival.

Overexpression of Sox17 in a transgenic mouse had the opposite effect of enhancing oligodendrocyte replacement in myelin lesions. Wnt signaling is pathologically increased in lesions. However, in the transgenic mouse, Sox17 prevented lesion-induced Wnt signaling, allowing recruited progenitor cells to complete maturation to oligodendrocytes. As Sox17 did not bind Wnt mediators in adult brain, we sought indirect mechanisms. We found that Sox17 also increased Sonic Hedgehog signaling in intact brain. Using genetic and pharmacological inhibition, we found that Hedgehog signaling is necessary for basal oligodendrocyte maintenance and survival, and functions upstream to regulate Wnt. In normal mice, Hedgehog stimulated Wnt; however, when Sox17 is overexpressed, Hedgehog suppressed Wnt. The co-administration of a small molecule Hedgehog pathway activator into myelin lesions enhanced oligodendrocyte regeneration and suppressed lesion-induced Wnt signaling, similar to Sox17 overexpression. Importantly, Hedgehog stimulation in Sox17 deficient mice failed to restore Hedgehog signaling and oligodendrocytes in lesions, indicating a vital role of Sox17.

CONCLUSIONS

While accomplishing our research goals of understanding the requirement for Sox17 in oligodendrocyte development and regeneration, and demonstrating its involvement in developmental signaling, our studies revealed a number of unexpected findings not previously predicted from cell culture studies. First, we demonstrated that Sox17 ablation disrupted postnatal oligodendrocyte development and cell regeneration after myelin damage in adult brain. This was the result of Sox17 function(s) in progenitor expansion, as well as maturation. Second, as a consequence of uncovering Sox17 function in progenitor cells, we demonstrate that Notch signaling is a target of Sox17 action, suggesting roles

in developmental signaling. Finally, through the analysis of a Sox17-overexpressing mouse mutant, we demonstrated that Sox17-mediated oligodendrocyte regeneration and white matter protection relies on enhanced Hedgehog signaling. Increased Hedgehog signaling attenuates pathological Wnt signaling in white matter lesions, allowing for successful oligodendrocyte regeneration. Although it is presently unknown how Hedgehog is increased by Sox17, an activator of the Hedgehog pathway stimulated oligodendrocyte regeneration and protection, indicating promising therapeutic potential in the application of Sox17 signaling targets for remyelination strategies.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Publications

- Chew LJ, Ming X, McEllin B, Dupree J, Hong E, Catron M, Fauveau M, Nait-Oumesmar B, Gallo V. Sox17 regulates a program of oligodendrocyte progenitor cell expansion and differentiation during development and in repair. *Cell Reports*, 2019 Dec 3; 29(10): 3173-3186. e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.121
- Ming X, Dupree J, Gallo V, Chew LJ. Sox17 promotes oligodendrocyte regeneration by modulating Hedgehog-Wnt signaling crosstalk. Manuscript submitted

Presentations

- Chew L-J, McEllin B, Ming X, Hong E, Dupree J, Catron M, Fauveau M, Nait-Oumesmar B, Gallo V. Sox17 ablation reveals a role in oligodendrocyte progenitor cell expansion and regeneration in Postnatal White matter. *American Society for Neurochemistry*. Riverside, CA. March 2018
- Chew L-J, Ming X, Dupree J.L., McEllin B., Gallo V. Sox17 transgenesis reveals sonic hedgehog- and Gli2-mediated oligodendrocyte differentiation in adult white matter. *Annual Meeting of Society for Neuroscience* 551.03, San Diego, CA. Novembre 6, 2018
- Chew LJ, McEllin B, Ming X, Hong E, Fauveau M, Catron M, Nait-Oumesmar B, Gallo V. Sox17 regulates Sox2 and promotes oligodendrocyte progenitor response to demyelination. *American Society for Neurochemistry*. Little Rock, AR. March, 2017
- Chew LJ, McEllin B, Hong E, Ming X, Catron M, Fauveau M, Nait-Oumesmar B, Gallo V. Sox17 regulates Sox2 and TCF7L2/TCF4 induction and promotes oligodendrocyte progenitor response to demyelination. *Annual meeting, Society for Neuroscience*, Washington DC, 2017
- Ming XT, Chew LJ, Dupree J, McEllin B, Gallo V. Sox17 promotes oligodendrocyte regeneration through reciprocal Wnt and Hedgehog pathway regulation. *Annual meeting, Society for Neuroscience*, Washington DC, Novembre 2017

- Chew LJ, Ming X, McEllin B, Gallo V. Sox17 suppression of Wnt/beta-catenin promotes oligodendrocyte regeneration through Hedgehog-Smoothed signaling. *Annual meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, CA. Novembre 12-16, 2016
- Burrell A, DeBoy C, Chew LJ, Ming X, Gallo V. Does the overexpression of Sox17 in mice alter proteins that bind beta-catenin? *Trinity Washington University Research Symposium*, Washington DC, April, 2016
- Chew LJ, Cephas D, DeBoy CA, Gallo V, Dupree J, Ming X. Sox17 overexpression alters extracellular matrix proteins and Hedgehog dynamics in adult white matter. *Annual meeting of the American Society for Neurochemistry*, Denver, CO. March 19-23, 2016
- Cruz K, DeBoy C, Ming X, Gallo V, Chew LJ. Sox17 transgenic mice reveal functional suppression of beta-catenin in neuroprotection. *19th Annual Undergraduate Research Symposium in the Chemical and Biological Sciences, Biochemical Sciences First prize*. Univ Maryland, Baltimore, MD. Oct, 2016. *AND Annual Biomedical Research Conference for Minority Students (ABRCMS) Neuroscience: Neurobiology Category Selected Oral Presentation, ABRCMS Undergraduate Research Symposium*, Orlando, FL. Novembre, 2016

Lectures and Oral Presentations

- Chew LJ (2017) Sox17 regulates Sox2 and TCF7L2/TCF4 induction, and promotes oligodendrocyte progenitor response to demyelination. *American Society for Neurochemistry Annual Meeting*, Little Rock, AR. March 2017
- Chew LJ (2016) Sox17: a journey of surprises in the oligodendrocyte lineage. *Dept of Pharmacological Sciences, School of Medicine, Stony Brook University*, New York. Novembre 1, 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 184.260 €
Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 3 years and the amount of € 184,260

Identificazione di un circuito neurale che controlla il rilascio dal midollo osseo di cellule immunitarie rilevanti per l'induzione dell'encefalite autoimmune sperimentale



Tiziana Vigo

IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Federico Ivaldi, Giovanni Ferrara, Maria Cristina Mariani

PREMESSE E OBIETTIVI

Nel midollo osseo (MO) le cellule staminali mesenchimali (CSM) controllano la maturazione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE), da cui originano le cellule del sistema immunitario. Questa funzione delle CSM è controllata dal sistema nervoso che agendo sulle CSM può aumentare la maturazione delle CSE, portando di fatto ad un aumento delle cellule immunitarie mature. Nell'ipotalamo, una regione del cervello coinvolta in alcune sensazioni come la fame o lo stress, ci sono dei neuroni (chiamati neuroni AgRP), che se funzionano poco oltre a ridurre la fame, fanno sviluppare una forma di sclerosi multipla (SM) particolarmente grave nei topi. In questo progetto abbiamo voluto verificare sui topi se le CSM del MO, controllate dal sistema nervoso attraverso i neuroni AgRP, contribuiscono alla produzione di cellule immunitarie nella sclerosi multipla.

RISULTATI

I nostri risultati hanno confermato che, nel topo con la SM, le CSM nel midollo osseo si attivano e fanno aumentare la produzione di cellule immunitarie, soprattutto dei linfociti, che hanno un ruolo importante nella malattia. Abbiamo scoperto che le CSM si attivano già prima della comparsa della malattia. Quindi ci siamo chiesti se la loro attivazione potesse essere un "campanello di allarme" che precede le ricadute nell'uomo. Abbiamo dosato nel sangue alcune cellule che sono rilasciate dal MO quando le CSM si attivano, e abbiamo scoperto che i pazienti con SM ne hanno di più rispetto ai soggetti sani. Nonostante i nostri dati dimostrino l'attivazione delle CSM nel MO nella SM, la somministrazione di una molecola che riduce

l'attivazione delle CSM, non ha modificato la gravità della malattia.

Il nostro studio sulla funzione dei neuroni AgRP nell'attivazione delle CSM nel midollo osseo ha dimostrato che se questi neuroni si attivano sono in grado di bloccare l'attivazione delle CSM e quindi di ridurre la produzione di cellule immunitarie.

CONCLUSIONI

Con questo studio abbiamo scoperto un nuovo meccanismo che contribuisce alla produzione di cellule immunitarie, soprattutto di linfociti, nella SM, cioè l'attivazione delle CSM nel midollo osseo. Anche se il farmaco che abbiamo utilizzato per bloccare l'attivazione delle CSM non è riuscito a migliorare la gravità della malattia nei topi, testeremo altre molecole che potrebbero rivelarsi efficaci nel contrastare la produzione di cellule immunitarie nella SM. Inoltre, in questo studio, abbiamo scoperto che l'attivazione dei neuroni AgRP rallenta la maturazione delle cellule immunitarie nella SM. Questa scoperta è molto importante, perché esistono diverse molecole note per la loro capacità di attivare i neuroni AgRP, che testeremo nei topi per la capacità di ridurre la gravità della SM. Inoltre i neuroni AgRP si attivano con l'esposizione al sole, un fattore ambientale che è stato associato a una minore gravità della SM, e ciò è in accordo con la nostra scoperta che la loro attivazione riduce la produzione di cellule immunitarie, importante nella SM. Quindi riteniamo che i risultati di questo studio pilota abbiano aperto una nuova strada per la comprensione dei meccanismi della SM e per sviluppare nuovi farmaci basati sul controllo dell'attivazione delle CSM e dei neuroni AgRP.

Identification of a neural circuit controlling the mobilization from the bone marrow of immune cells relevant for experimental autoimmune encephalomyelitis induction

INTRODUCTION AND AIMS

In the bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSC) control the maturation of hematopoietic stem cells (HSC), from which the cells of the immune system originate. This function of MSC is controlled by the nervous system. Indeed, the activation of MSC can promote the maturation of HSC, leading to an increase in mature immune cells. In the hypothalamus, a region of the brain involved in sensations such as hunger or stress, there are neurons (called AgRP neurons). If AgRP neurons work little in mice, more than reducing hunger, develop a form of multiple sclerosis (MS) that is particularly severe. In this project we wanted to test in mice whether MSC in the BM, controlled by the nervous system through AgRP neurons, contribute to the production of immune cells in MS.

RESULTS

Our results confirmed that, in mice with MS, MSC are activated leading to an increased production of immune cells, especially lymphocytes, which play an important role in MS. We have found that MSC are activated even before the onset of the disease. We wondered if their activation could be an early hallmark that precedes relapses in humans. Thus, we quantified in the blood of MS patients some cells that are released from BM when MSC are activated. We found that MS patients have more of these cells as compared to healthy subjects. Although our data show the activation of MSC in BM in MS, the administration of a drug that reduc-

es the activation of MSC has not changed the severity of the disease in mice.

Our study on the function of AgRP neurons in the activation of BM MSC has shown that the activation of these neurons can block the activation of MSC in the BM of mice with MS, thus reducing the production of immune cells.

CONCLUSIONS

With this study we have discovered a new mechanism that contributes to the production of immune cells, especially lymphocytes, in MS, i.e. the activation of MSC in the BM. Although the drug we used to block the activation of MSC failed to improve the severity of the disease in mice, we will test other molecules that may be effective in counteracting the production of immune cells in MS. In addition, in this study, we found that the activation of AgRP neurons impairs the maturation of immune cells in MS. This discovery is very important because there are several molecules known for their ability to activate AgRP neurons. In addition, AgRP neurons are activated by exposure to the sun, an environmental factor that has been associated with lower MS severity, and this is in agreement with our finding that their activation reduces the production of important immune cells in MS. Therefore, we believe that the results of this pilot study have opened up a new avenue for understanding the mechanisms of MS and for developing new drugs based on controlling the activation of MSCs and AgRP neurons.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Vigo T, Ivaldi F, Ferrara G, Mariani MC, Scotto M, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Norepinephrine signals to Beta-3 Adrenergic Receptor-expressing bone marrow cells promote lymphoid hematopoiesis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. XIII World Immune Regulation Meeting, Davos, Switzerland, 2019*
- *Vigo T, Ivaldi F, Ferrara G, Mariani MC, Scotto M, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Sympathetic nervous system signals to beta-3 adrenergic receptor-expressing bone marrow cells promote lymphoid hematopoiesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. XXVIII congresso Associazione Italiana Neuroimmunologia, Camogli, Genoa, Italy, 2019*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Coinvolgimento della proteina NINJ2 nell'attività di malattia della sclerosi multipla



Melissa Sorosina

Istituto di Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Federica Esposito, Silvia Peroni, Elisabetta Mascia, Silvia Santoro, Filippo Martinelli Boneschi, Massimo Filippi

PREMESSE E OBIETTIVI

La causa della sclerosi multipla non è ancora stata del tutto identificata, ma è noto che la migrazione delle cellule immunitarie dal sangue periferico all'interno del sistema nervoso centrale attraverso la barriera emato-encefalica è un evento estremamente importante. Questo è supportato anche dall'esistenza di farmaci molto efficaci che sono in grado di legare alcune proteine coinvolte nel passaggio delle cellule al sistema nervoso centrale, riducendo o bloccando questo processo. Queste proteine, definite "di adesione", sembrano quindi essere essenziali per lo sviluppo e il mantenimento dell'infiammazione nella sclerosi multipla e per questo motivo sono sempre più oggetto di studi mirati allo sviluppo di nuovi farmaci.

Il presente progetto aveva lo scopo di studiare il coinvolgimento della proteina Ninjurin-2 (NINJ2) nei processi infiammatori e migratori attraverso la barriera emato-encefalica nella sclerosi multipla. L'interesse in questa proteina è scaturito a seguito di osservazioni preliminari ottenute dal nostro laboratorio per cui la variante genetica rs7298096, in grado di regolare l'espressione di NINJ2, è risultata essere associata a un ridotto tempo di insorgenza della prima ricaduta clinica in corso di trattamento con Interferone-Beta. La nostra ipotesi è che NINJ2 possa essere coinvolta nello sviluppo delle ricadute che si osservano clinicamente nei pazienti proprio perché importante per la migrazione delle cellule immunitarie attraverso la barriera emato-encefalica.

Al fine di verificare questa ipotesi, questo progetto prevedeva due fasi: i) verifica sperimentale della capacità di rs7298096 di regolare l'espressione genica; ii) caratterizzazione del coinvolgimento di NINJ2 nell'infiammazione, valutando l'effetto degli stimoli infiammatori sull'espressione di NINJ2 e l'influenza di NINJ2 sulla migrazione di monociti e cellule monocitarie attraverso un surrogato *in vitro* della barriera emato-encefalica.

RISULTATI

In accordo con gli obiettivi del progetto, inizialmente abbiamo confermato *in vitro* che il locus genetico di rs7298096 è in grado di regolare l'espressione genica. Nello specifico, la presenza del genotipo GG riduce l'espressione, mentre la presenza dell'allele A aumenta l'espressione del gene NINJ2. Da notare che l'allele G è a sua volta associato sia a una minore attività di malattia che a un livello inferiore di espressione di NINJ2, suggerendo che i pazienti portatori dell'allele G in rs7298096 abbiano una minore attività di malattia proprio attraverso l'effetto regolatorio su NINJ2. Successivamente abbiamo valutato i cambiamenti nell'espressione di NINJ2 in condizioni pro-infiammatorie mediante esperimenti di PCR e immunocitochimica. Diversamente da quanto ipotizzato inizialmente, ovvero che un ambiente pro-infiammatorio favorisca l'espressione di NINJ2 in cellule immunitarie, abbiamo osservato che nelle cellule monocitarie sia l'espressione genica che quella proteica di NINJ2 vengono ridotte a seguito di stimolazione con citochine pro-infiammatorie (quali LPS, TNF α , IFN γ). Al contrario, in cellule hCMEC/D3, un modello *in vitro* di barriera emato-encefalica umana, stimoli pro-infiammatori, quali quello mediato da LPS, favorisce la produzione di NINJ2. Sulla base di questi risultati abbiamo quindi effettuato degli esperimenti di migrazione cellulare *in vitro* creando un surrogato di barriera emato-encefalica e valutando la migrazione di cellule in presenza o meno di stimoli pro-infiammatori. Sono stati prelevati monociti da un totale di 11 pazienti con sclerosi multipla e 11 individui sani. Gli esperimenti hanno mostrato che, dopo stimolazione della barriera formata da cellule hCMEC/D3 con LPS, il tasso di migrazione delle cellule prelevate dai pazienti è più elevato rispetto a quelle prelevate dai sani e che tale migrazione correla positivamente con l'espressione di NINJ2 nei monociti.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che NINJ2 possa avere un ruolo importante nell'instaurarsi delle ricadute di malattia e nei processi di migrazione delle cellule immunitarie attraverso la barriera emato-encefalica. Benché

siano necessari ulteriori esperimenti per chiarire gli esatti meccanismi molecolari coinvolti, questi risultati suggeriscono che NINJ2 possa avere un ruolo nella patogenesi della malattia e, nel lungo termine, aprono la strada per definire nuovi target terapeutici.

Involvement of NINJ2 protein in multiple sclerosis disease activity

INTRODUCTION AND AIMS

Although the cause of multiple sclerosis has not yet been fully characterized, it is known that the migration of immune cells from peripheral blood into the central nervous system via the blood-brain barrier is extremely important. This is also supported by the existence of effective drugs that are able to bind proteins involved in the cell migration into the central nervous system, reducing or blocking the process. These proteins, defined as "adhesion proteins", are therefore essential for the development and maintenance of inflammation in multiple sclerosis and for this reason they are extensively studied to develop new drugs. The present project is aimed to study the involvement of the Ninjurin-2 protein (NINJ2) in inflammation and in migratory processes through the blood-brain barrier in multiple sclerosis. The interest in this protein arose after preliminary observations obtained by our laboratory, regarding the genetic variant rs7298096, able to regulate the expression of NINJ2, which was found to be associated with a shorter time to first relapse in multiple sclerosis patients treated with Interferon-Beta. Our hypothesis is that NINJ2 may be involved in the migration of immune cells through the blood-brain barrier affecting in turn the development of relapses.

In order to test this hypothesis, this project was divided in two phases: i) experimental verification of the ability of rs7298096 to act as regulator of the gene expression; ii) characterization of the involvement of NINJ2 in inflammation, evaluating the effect of inflammatory stimuli on the expression of NINJ2 and the influence of NINJ2 on the migration of monocytes and monocytoïd cells through an *in vitro* surrogate of the blood-brain barrier.

RESULTS

According to the objectives of the project, we initially confirmed *in vitro* that the genetic locus of rs7298096 is able to regulate gene expression. Specifically, the presence of the GG genotype reduces the expression, while the presence of the A allele increases the expression of NINJ2.

To note, the G allele was found to be associated both with a lower disease activity and also with a lower level of expression of NINJ2, suggesting that patients carrying the G allele in rs7298096 have a lower disease activity due to the downregulatory effect on NINJ2.

We subsequently assessed changes in NINJ2 expression in pro-inflammatory conditions by performing PCR and immunocytochemistry experiments. Despite our initial assumption, i.e. that a pro-inflammatory environment promotes the expression of NINJ2 in immune cells, we observed that both NINJ2 gene and protein expression are reduced in monocytes when stimulated with pro-inflammatory cytokines (such as LPS, TNF α , IFN γ). On the contrary, in hCMEC/D3 cells, an *in vitro* model of human blood-brain barrier, pro-inflammatory stimulation (specifically LPS), increases the production of NINJ2. Based on these results, we then carried out cell migration experiments by creating an *in vitro* blood-brain barrier surrogate and evaluating the migration of monocytes and monocytoïd cells in the presence or not of pro-inflammatory stimuli. Monocytes from 11 patients with MS and from 11 healthy individuals were collected. We observed that, when stimulating the hCMEC/D3 cells barrier with LPS, cells collected from patients show a higher migration rate than the ones collected from healthy individuals, with a positive correlation between the migration rate and the expression of NINJ2.

CONCLUSIONS

The results obtained support the hypothesis that NINJ2 may have an important role in the manifestation of clinical relapses and in the migration processes of immune cells through the blood-brain barrier. Although further experiments are needed to clarify the exact molecular mechanisms, these results suggest that NINJ2 could be involved in the pathogenesis of the disease and, in the long-term, open the way for the identification of new therapeutic targets.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Peroni S, Sorosina M, Malhotra S, Clarelli F, Osiceanu AM, Ferrè L, Roostaei T, Rio J, Midaglia L, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Guaschino C, Radaelli M, Citterio L, Lechner-Scott J, Spataro N, Navarro A, Martinelli V, Montalban X, Weiner HL, de Jager P, Comi G, Esposito F, Comabella M, Martinelli-Boneschi F. A pharmacogenetic study implicates NINJ2 in the response to Interferon- β in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2019 Jun 21:1352458519851428
- Peroni S, Sorosina M, Osiceanu AM, Clarelli F, Guaschino C, Malhotra S, Río J, Midaglia L, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Lechner-Scott J, Spataro N, Navarro A, Montalban X, Martinelli V, Comi G, Esposito F, Comabella M, Martinelli Boneschi F. Involvement of NINJ2 in inflammatory activity in MS. Poster presentation at 34th ECTRIMS, Berlin, Germany, October 10-12th 2018
- Peroni S, Osiceanu AM, Santoro S, Tosi M, Clarelli F, Martinelli Boneschi F, Esposito F, Sorosina M. "Study on NINJ2 adhesion molecule in inflammation and in immune cells migration through the BBB". Poster presentation at the Scientific Retreat of San Raffaele Hospital, Baveno, Italy, March 14-16th 2019

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 63.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 3 months) and the amount of € 63,000

Un modello umanizzato di barriera ematoencefalica per investigare l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nella sclerosi multipla: verso un approccio di medicina personalizzata



Michela Matteoli

Department of Biomedical Sciences, Humanitas University (HUNIMED), Pieve Emanuele (MI)

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Eliana Lauranzano, Elena Campo

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Eduardo Nobile Orazio e Giuseppe Liberatore, Sezione Autonoma di Malattie Neuromuscolari e Neuroimmunologia, Istituto Clinico Humanitas e UniMI, Milano

PREMESSE E OBIETTIVI

Tra le ipotesi più accreditate per spiegare il meccanismo di malattia alla base della sclerosi multipla (SM), vi è quella che le cellule immunitarie (linfociti T) attraversino la barriera che protegge il cervello, la barriera ematoencefalica (BEE), formata da astrociti e cellule endoteliali, e innescano nel cervello processi infiammatori e neurodegenerativi. L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di sviluppare una piattaforma personalizzata di BEE, che impieghi cellule endoteliali e cellule astrocitarie umane e cellule T derivate dal paziente SM, per studiare i processi patologici che avvengono quando i linfociti attraversano le cellule della BEE nella SM. Lo scopo è quello di sviluppare e ottimizzare strategie terapeutiche in modo paziente-specifico. Questo passo verso un approccio di medicina personalizzata nella SM è altamente auspicabile, data l'enorme eterogeneità sia nelle caratteristiche della malattia che nelle risposte al trattamento.

RISULTATI

Obiettivo del nostro progetto era creare un modello di BEE utilizzando astrociti e cellule endoteliali umane. Gli astrociti umani primari (hA) sono stati purificati dall'area periferica di campioni chirurgici di pazienti sottoposti a resezione di tumore cerebrale e sono stati successivamente caratterizzati per confermarne l'identità astrocitaria. Abbiamo anche ottimizzato con successo le condizioni sperimentali per isolare e crescere *in vitro* cellule endoteliali umane primarie (hE) da controlli sani e pazienti con SM.

Le cellule endoteliali e gli astrociti sono stati integrati in un modello di BEE di co-cultura in contatto. hE sono state espanse in coltura come monostrato su di una membrana permeabile ricoperta con proteine di matrice (lato vascolare); mentre hA sono stati mantenuti sul lato opposto (lato cervello). I monostrati di hE hanno mostrato buone proprietà funzionali, come dimostrato dalle misurazioni della resistenza elettrica trans-endoteliale (TEER) e dalle proprietà di permeabilità; l'integrazione con hA ha ulteriormente migliorato le proprietà della barriera.

Per realizzare il modello di BEE, sono state anche utilizzate linee cellulari di astrociti umani (cellule SVG) ed endoteliali (cellule hCMEC/D3), e si è dimostrato che la loro integrazione nella nostra piattaforma forma una barriera con le caratteristiche di impermeabilità attese. Cellule immunitarie (linfociti T) sono state quindi isolate da soggetti sani o pazienti con SM e sono state ottimizzate le condizioni sperimentali per studiarne la transmigrazione attraverso il modello di BEE umano. Il passaggio dei linfociti T verso il lato cerebrale del modello di BEE è stato analizzato in presenza della chemochina CCL2 (MCP-1), che innesca l'infiltrazione delle cellule immunitarie e contribuisce alla patogenesi della SM. Le cellule T sono state in grado di migrare attraverso il modello di BEE e la loro migrazione è stata modulata da diverse molecole. Ad esempio, abbiamo dimostrato che la citochina pro-infiammatoria TNF-alfa, i cui livelli aumentano durante la SM, è in grado di aumentare la transmigrazione delle cellule T. In conclusione, questi risultati indicano che il nostro obiettivo, ovvero la mes-

sa a punto di un modello di BEE umanizzato per studiare la transmigrazione di cellule T derivate da pazienti con SM e astrociti derivati da campioni chirurgici, è stato raggiunto.

CONCLUSIONI

Il modello di BEE che abbiamo messo a punto si è dimostrato essere uno strumento molto promettente per indagare la migrazione dei linfociti T attraverso la BEE, nonché i meccanismi molecolari che sono coinvolti in questo processo. Molti dei farmaci attualmente in uso per il trattamento della SM mirano a prevenire l'ingresso delle cellule

immunitarie a livello della BBB. Tuttavia non era possibile finora avvalersi di modelli cellulari avanzati di BEE che consentissero di indagare la migrazione delle cellule immunitarie in risposta ai trattamenti farmacologici in modo specifico per ogni paziente. Riteniamo quindi che il modello da noi messo a punto possa dare un contributo di grande rilievo non solo per definire meccanismi molecolari che regolano tale processo, ma anche per ottimizzare il trattamento dei singoli pazienti, consentendo così di raggiungere i migliori risultati clinici nel lungo termine.

A humanized model of blood brain barrier to investigate immune cells infiltration in multiple sclerosis: toward a personalized medicine approach

INTRODUCTION AND AIMS

Among the most accepted hypotheses to explain the disease mechanism underlying multiple sclerosis (MS), is the fact that immune cells (T lymphocytes) cross the barrier that protects the brain, the blood brain barrier (BBB), formed by astrocytes and endothelial cells, triggering inflammatory and neurodegenerative processes. The objective of our project was to develop a miniaturized, personalized, bio-mimetic BBB platform employing human endothelial, astrocytic cells and patient-derived T cells, to study the pathological processes and the altered neuro-immune cross talk that occur when lymphocytes migrate across BBB cells in MS. The aim is to develop and optimize therapeutic strategies in a patient-specific manner. This step toward a personalized medicine approach in MS is highly desirable, given the enormous heterogeneity of both disease course and treatment responses.

RESULTS

During our project we have set up a model of BBB using human astrocytes and endothelial cells. Primary human astrocytes (hA) were purified from the peripheral area of surgical samples of patients undergoing cerebral tumor resection and were subsequently characterized to confirm their astrocytic identity. We also successfully set up the conditions for isolating and culturing primary human endothelial cells (hE) from healthy controls and MS patients. Endothelial cells and astrocytes were integrated in a contact co-culture BBB model. Human endothelial cells were grown as a monolayer on top of a matrix-coated permeable membrane (vascular side), while hA were cultured on the opposite side (brain side). hE monolayers displayed

good functional properties, as demonstrated by measurements of trans-endothelial electrical resistance (TEER) and leakage properties, and the integration of hA further improved the barrier properties.

We also found that human astrocyte (SVG cells) and endothelial (hCMEC/D3 cells) cell lines, when integrated in our platform, are able to form a BBB which also displays the required impermeability features. Immune cells (T lymphocytes) were then isolated from healthy subjects or MS patients and the conditions to investigate their transmigration across the human BBB were settled. T lymphocyte migration toward the brain side of the BBB was analyzed under the influence of the chemokine CCL2 (MCP-1), which triggers immune cell infiltration and contributes to the pathogenesis of MS. T lymphocytes were able to migrate across the BBB and their migration was modulated by different molecules. As an example, we demonstrated that the pro-inflammatory chemokine TNF-alpha, which increases during MS, is able to increase the transmigration of T cells. In conclusion, these results indicate that our objective, i.e. the setting of a humanized BBB to study the transmigration of T lymphocytes derived from MS patients and astrocytes derived from surgical specimens, has been successfully achieved.

CONCLUSIONS

The BBB model that we developed has proven to be an extremely promising tool to investigate: the migration of T lymphocytes through the BBB, the molecular mechanisms that are involved in this process. Many drugs that are currently in use for the treatment of MS aim at preventing the entry of immune cells into the BBB. However,

it has not been possible so far to make use of advanced cellular models of BBB that would allow to investigate the migration of immune cells in response to drug treatments specifically for each patient. We therefore believe that the model we have developed can make a major contribution

not only to defining the molecular mechanisms that regulate this process, but also to optimize the treatment of individual patients, thus allowing us to achieve the best long-term clinical results.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Lauranzano E, Campo E, Rasile M, Pizzocri M, Passoni L, Molteni R, Bello L, Pozzi D, Pardi R, Matteoli M. and Ruiz A. Setting of a microfluidic human model of blood brain barrier employing primary human astrocytes. *Adv. Biosys.* 2019, 3, 1800335
- Lauranzano E, Molteni R, Filipello F, Grassi F, Pardi R, Matteoli M. Poster presentation at Keystone Symposia meeting on New Frontiers in Neuroinflammation, Colorado, USA, June 17-21, 2018
- Matteoli M, invited speaker, Fyssen Foundation, "News insights into neuro-glia communication", Paris, France, December 3-4th, 2018
- Matteoli M, invited speaker, Eibsee Meeting on "Cellular Mechanisms of Neurodegeneration", Eibsee, Germany, October 24-26th, 2018
- Matteoli M, invited speaker, Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, Germany, May 31st, 2018
- Matteoli M, invited speaker at Max Planck Institute for biophysical Chemistry, Dept. Neurobiology Gottingen.
- Lauranzano E, invited speaker at Refresher Course for Physicians, Multiple Sclerosis: from research to therapy - Humanitas Research Hospital, Milan, Italy, November 10th, 2018
- Lauranzano E, Invited speaker at First Humanitas Neuro Center Science Day, Milan, Italy, June 11th, 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

CuZn Superossido dismutasi (SOD-1), specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), attivazione linfocitaria T e controllo della tolleranza immunitaria nella sclerosi multipla



Giuseppina Ruggiero

Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Valentina Rubino, Anna Teresa Palatucci

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Giuseppe Terrazzano, Angela Giovazzino, *Dipartimento di Scienze, Università degli Studi della Basilicata, Potenza*

Giuseppe Orefice, Rosa Iodice, *Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli*

Paolo Mondola, Simona Damiano, Giuliana La Rosa, Antonio D'Errico, *Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli*

PREMESSE E OBIETTIVI

Una serie di evidenze indica il coinvolgimento delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) nella regolazione della risposta linfocitaria T antigene-dipendente. I meccanismi di regolazione dipendenti dai ROS sono generalmente mediati dai perossidi, più stabili e capaci di diffondere agevolmente nei vari compartimenti endocellulari. L'enzima SOD-1 è la molecola intracellulare deputata fisiologicamente alla generazione di perossidi, in quanto capace di trasformare, nel citoplasma, radicali dell'ossigeno in perossidi e ossigeno molecolare. Nostri dati indicano che segnali mediati da SOD-1 sono coinvolti nella regolazione dell'attivazione linfocitaria T antigene-dipendente. Abbiamo infatti osservato che SOD-1 viene rapidamente reclutata in sede recettoriale in linfociti T umani stimolati dall'antigene e che una secrezione microvescicolare di SOD-1 si accompagna all'attivazione linfocitaria T. Inoltre, i livelli di SOD-1 si presentano significativamente ridotti, alla diagnosi, nel liquido cefalo spinale e nei linfociti isolati dal sangue periferico di persone con sclerosi multipla (SM), mentre sono notevolmente aumentati in corso di trattamento immuno-modulante. Questo progetto ha lo scopo di studiare il coinvolgimento di SOD-1 nella regolazione della risposta

immunitaria linfocitaria T analizzando altresì la possibilità che i livelli intracellulari di SOD-1 possano rappresentare un criterio utile alla definizione dell'efficacia terapeutica delle strategie immuno-modulanti impiegate per il trattamento di SM.

RISULTATI

I nostri dati indicano che la somministrazione di SOD-1 ricombinante a linfociti T attivati *in vitro* favorisce l'induzione di un profilo pro-infiammatorio caratterizzato da un aumento significativo della disponibilità di IL-17, una citochina associata al verificarsi di condizioni di infiammazione cronica. Questo effetto si dimostra dipendente dall'attività enzimatica di SOD-1, in quanto viene perso da Apo-SOD la variante molecolare di SOD-1 priva di attività dismutasica. Abbiamo inoltre osservato, in una corte di 108 persone con SM-RR, che a livelli elevati di SOD-1 nei linfociti T si accompagna un profilo immunitario caratterizzato dalla presenza più consistente di linfociti T regolatori (Treg), una sottopopolazione linfocitaria dotata di notevole capacità immunosoppressiva. Da notare che elevati livelli intracellulari di SOD-1 nei linfociti T si associano ad un aumento significativo dell'espressione dell'esone 2

del fattore trascrizionale Foxp3 nelle Treg. Tale condizione è stata correlata all'efficienza immunomodulante della popolazione Treg. Abbiamo inoltre osservato la capacità dei linfociti Treg di controllare in maniera specifica l'espansione antigene-dipendente e lo stato di attivazione di cellule T citotossiche, patogeneticamente rilevanti per il danno tissutale nei micrositii infiammatori. La possibilità che livelli persistentemente bassi di SOD-1 nei linfociti T di persone con SM possano associarsi alla presenza di una malattia resistente alle strategie terapeutiche impiegate necessita di ulteriori approfondimenti sperimentali.

CONCLUSIONI

I nostri dati, *in vitro*, indicano che la presenza di SOD-1 extracellulare, che si associa fisiologicamente a secrezione microvescicolare dell'enzima da parte di linfociti T attivati, determina lo sviluppo di un profilo pro-infiammatorio caratterizzato dalla produzione di aumentati livelli di IL-17. L'abilità dell'enzima di generare perossidi si dimostra strettamente legata a tale effetto. Questa osservazione è compatibile con l'ipotesi che bassi livelli di SOD-1 nei lin-

fociti T (quali quelli da noi evidenziati in persone con SM alla diagnosi) potrebbero essere correlati a elevata secrezione vescicolare dell'enzima da parte di effettori linfocitari T iper-attivati. Questo profilo potrebbe rispecchiare lo stabilirsi di *pathways* molecolari (direttamente dipendenti da SOD-1) volti a esacerbare la disponibilità di citochine pro-infiammatorie, verosimilmente correlati a un difettivo controllo della tolleranza immunitaria. L'osservazione che incrementi significativi nei livelli intracellulari di SOD-1 si osservino in persone con SM in cui il trattamento immunomodulante si associa a un profilo immunitario caratterizzato da elevati livelli di effettori Treg particolarmente efficienti (caratterizzati da elevata espressione dell'esone 2 del fattore trascrizionale Foxp3) è in linea con tale ipotesi. I nostri dati nel loro complesso aggiungono i segnali dipendenti da SOD-1 alla complessa rete molecolare coinvolta nel mediare la disregolazione della risposta infiammatoria correlata alla patogenesi delle malattie immuno-mediate, quali la SM. Tali osservazioni propongono SOD-1 quale bersaglio di strategie terapeutiche innovative, nonché elemento di valutazione prognostica di SM.

CuZn Superoxide dismutase (SOD-1), intracellular Reactive Oxygen Species (ROS), T cell activation and immune tolerance control in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Growing evidence indicates the involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the regulation of antigen-dependent T cell response. ROS-dependent regulatory networks are usually mediated by hydrogen peroxides, more stable than other short-lived ROS molecules and able to freely diffuse inside the cell and through cell membranes. SOD-1 molecule physiologically mediates intracellular scavenging of oxygen radicals to H₂O₂ and molecular oxygen. Our preliminary data indicate that SOD-1-mediated signalling is involved in antigen-dependent T cell activation. Indeed, we found rapid SOD-1 intracellular re-localisation followed by secretion of the enzyme by activated T lymphocytes. We also observed significant reduction of SOD-1 level in Cerebro-Spinal Fluid (CSF) and leukocyte population of persons with MS while SOD-1 intracellular levels are significantly increased in lymphocytes when immune-modulating treatments were performed. This project investigated on the involvement of SOD-1 in immune response control also addressing the possibility that intracellular SOD-1 levels in peripheral T cells might represent a valuable criterion to evaluate the effectiveness of immune-modulating strategies in MS.

RESULTS

We found that administration of recombinant SOD-1 to activated T cells *in vitro* is associated with the induction of a proinflammatory profile characterized by increased IL-17 production, a cytokine largely associated with chronic inflammatory conditions. This effect is dependent on the functional effectiveness of the enzyme. Indeed, Apo-SOD, the molecule without enzymatic activity, is also unable to affect pro-inflammatory activity of human T cell effectors *in vitro*. We also observed, in a cohort of 108 persons with MS, that higher intracellular SOD-1 levels in T cells were significantly associated with an immune profile characterized by increased number of regulatory T cells (Treg), a major immune-modulating subset, regardless the undergoing treatment. We also observed the ability of Treg to specifically control the expansion and activation of cytotoxic T cell effectors, pathogenetically relevant for tissue damage in inflammatory microsites. Notably, the Treg subset from MS persons showing high levels of intracellular SOD-1, is characterized by increased expression of Foxp3-exon 2, consistently associated with effective immune-modulation activity by the Treg population. The possibility that persistent low SOD-1 intracellular levels in

T cells might be associated with the inability of the therapeutic regimen to restore an effective tolerance control in MS needs further investigation.

CONCLUSIONS

Our *in vitro* data indicate that extracellular SOD-1, usually associated to micro-vesicle secretion by activated T lymphocytes, participates in the induction/enhancement of a pro-inflammatory microenvironment characterized by high IL-17 production. The ability of the enzyme to generate peroxides is strictly related with such effect. This observation is conceivable with the hypothesis that low intracellular SOD-1 levels in T cells (by us observed in MS at disease onset) might be related to increased secretion of the enzyme by chronically activated adaptive

immune effectors. This profile might be related with the establishment of a pro-inflammatory loop, likely associated with the deranged immune tolerance control observed in inflammatory diseases, like MS. We found that higher SOD-1 intracellular levels, likely related to lower SOD-1 secretion, characterize peripheral T cells from persons with MS, undergoing immune-modulating therapy, with an immune profile showing increasing number of effective regulatory T cells. Our data add SOD-1 mediated signaling to the pro-inflammatory pathways likely involved in the deranged tolerance control associated with MS pathogenesis. The possibility to target such molecule for innovative therapy approaches and/or for prognostic purpose represents an intriguing working hypothesis.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Giovazzino A, Leone S, Rubino V, Palatucci AT, Cerciello G, Alfinito F, Pane F, Ruggiero G, Terrazzano G. *Reduced Regulatory T Cells (Treg) in Bone Marrow preferentially associate with the expansion of cytotoxic T lymphocytes in Low Risk MDS patients.* *Brit. J. Haematol.* 2019, 185 (2), 357-60
- Iovino A, Rubino V, Palatucci AT, D'Errico A, Iodice R, Damiano S, Giovazzino A, La Rosa G, Orefice G, Mondola P, Terrazzano G, Ruggiero G. *CuZn Superoxide dismutase (SOD-1), intracellular reactive oxygen species (ROS), T cell activation and immune T CELL ACTIVATION AND IMMUNE tolerance control in Multiple Sclerosis.* 50° Congresso Società Italiana di Neurologia Bologna, (12-15 October 2019); Poster 782
- Rubino V, Palatucci AT, Iodice R, La Rosa G, D'Errico A, Giovazzino A, D'Ambrosio V, Damiano S, Orefice G, Mondola P, Terrazzano G, Ruggiero G. *CuZn Superossido Dismutasi (SOD-1), Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), attivazione delle cellule T e controllo della Tolleranza Immunitaria nella Sclerosi Multipla.* Giornate Scientifiche della Scuola di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Biotecnologie; Università di Napoli Federico II, Napoli, 28 February-3 March 2020, Naples, Italy

Progetto di ricerca finanziato con bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year (extended by 9 months) and the amount of € 30,000

Regolazione del metabolismo cellulare nei linfociti di pazienti con forme progressive di sclerosi multipla



Marcello Pinti

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Sara De Biasi, Elena Bianchini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Anna Maria Simone, *Unità di Neurologia, Ospedale di Carpi, AUSL Modena, Carpi (MO)*

Diana Ferraro, Francesca Vitetta, Patrizia Sola, *Centro per la Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Nuovo Ospedale Civile Sant'Agostino Estense (NOCSAE), Modena*

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune nella cui patogenesi sono cruciali i linfociti T autoreattivi. L'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule T sono processi che richiedono energia, strettamente associati a cambiamenti nell'assunzione di nutrienti e nel metabolismo cellulare. Mentre le cellule T naïve (TN, cellule "nuove" del sistema immunitario, mai attivate in precedenza) si basano sulla fosforilazione ossidativa e sull'ossidazione degli acidi grassi, le cellule T attivate aumentano la glicolisi aerobia, la quale distingue le cellule effettrici T helper (Th) 1, Th2 e Th17 dalle cellule T regolatorie, che usano l'ossidazione degli acidi grassi. Alla base di molte risposte immunitarie aberranti vi è un inappropriato rimodellamento metabolico; abbiamo perciò ipotizzato che le cellule T di pazienti con diverse forme di SM potessero avere una diversa capacità di attivare queste diverse vie metaboliche, e che tali differenze potessero contribuire alle differenze osservate nel decorso della malattia, in particolare nelle forme progressive. Ci siamo perciò posti l'obiettivo di analizzare i profili metabolici e la funzionalità mitocondriale delle cellule T nei pazienti con forme progressive di SM, e di individuare i meccanismi regolativi alla base delle differenze osservate, in diverse sottopopolazioni di cellule T.

RISULTATI

Sono stati selezionati 53 pazienti con sclerosi multipla progressiva (22 pazienti con forma primariamente progressiva, PP, 31 con forma secondariamente progressiva, SP) selezionati presso il "Centro per le malattie demieliniz-

zanti" dell'Unità di Neurologia di Modena (Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense - Modena). Sono stati analizzati anche 20 soggetti sani di età e sesso paragonabile ai pazienti con SM. Su questi pazienti abbiamo prima caratterizzato le varie sottopopolazioni di cellule T, osservando un generale spostamento di queste cellule verso un fenotipo più senescente, ovvero con una maggiore presenza di cellule giunte al termine del loro processo di differenziamento, in particolare nei pazienti con SM PP.

Per capire se le differenze nelle popolazioni di cellule T tra pazienti e controlli erano dovute a una loro diversa capacità di proliferare dopo essere state attivate, abbiamo analizzato questa funzione tra le sottopopolazioni di T, osservando una minore capacità di proliferare delle cellule T sia CD4+ che CD8+ di pazienti con SM PP, ma non di quelle di pazienti con SM SP. I pazienti con SM PP hanno anche mostrato una più alta produzione di citochine proinfiammatorie (in particolare IFN-gamma e IL-17) rispetto ai pazienti con SM SP e ai controlli sani dopo attivazione.

Ci siamo allora chiesti se queste differenze fossero dovute a una diversa capacità di attivare le vie metaboliche menzionate in precedenza. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule T CD4+. Abbiamo perciò isolato le cellule CD4+ TN e T *effector memory* (TEM, cellule che già in precedenza erano andate incontro ad attivazione) e quindi determinato la loro attività metabolica. In assenza di stimolazione, queste cellule mostravano una attività metabolica bassa sia nei pazienti che nei controlli. Quando queste cellule venivano invece attivate, mostravano un comportamento metabolico profondamente diverso tra pazienti con SM PP e SM SP.

I linfociti TN e TEM dei pazienti con SM PP hanno mostrato un uso ridotto della respirazione cellulare e un maggiore uso della glicolisi rispetto ai pazienti con SM SP e ai controlli. Inoltre, i mitocondri dei linfociti dei pazienti PP sono apparsi più piccoli, rotondi e frammentati, con una ultrastruttura meno organizzata, e con un minore potenziale di membrana. Anche i fattori di trascrizione che supportano la respirazione e la formazione di nuovi mitocondri è apparsa minore nei pazienti con SM PP rispetto ai pazienti con SM SP e ai controlli. Infine, le cellule T della memoria effettrice nei pazienti con SM PP mostravano livelli più elevati di trasportatore di glucosio-1 (necessario per fornire il glucosio utilizzato nella glicolisi) e una maggiore espressione di geni (e delle corrispondenti proteine) che supportano la glicolisi, rispetto sia ai pazienti con

SM SP che ai soggetti sani.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i nostri dati indicano che le cellule T dei pazienti con forme primariamente e secondariamente progressive di SM sono molto diverse dal punto di vista fenotipico e metabolico, e hanno una differente capacità di attivare le vie metaboliche necessarie per il loro differenziamento. In particolare, le cellule T dei pazienti primariamente progressivi mostrano un fenotipo marcatamente senescente, e una chiara tendenza ad attivare e mantenere attiva la glicolisi dopo stimolazione. Nonostante quindi si tratti in entrambi i casi di forme progressive, i meccanismi che dal punto di vista immunometabolico portano verso l'una o l'altra forma di SM sono profondamente diversi.

Regulation of cell metabolism in lymphocytes from patients with progressive forms of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Autoreactive T cells play a crucial role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). The activation, proliferation and differentiation of T cells energy-requiring processes, and closely associated with changes in nutrient intake and cellular metabolism. While naïve T cells (TN, cells that had never undergone activation) mainly rely on oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation, activated T cells increase aerobic glycolysis, which distinguishes T helper (Th) 1, Th2 and Th17 effector cells from regulatory T cells, which use the oxidation of fatty acids.

Several aberrant immune responses are characterized by an impaired metabolic remodeling of immune cells; we therefore reasoned that such an impairment could be also present in MS. In particular, we hypothesized that T cells from patients with different forms of MS could have a different ability to activate different metabolic pathways, and that these differences contribute to the differences observed in the course of the disease, especially in the progressive forms. Thus, the goal of this project was to analyze the metabolic profiles and mitochondrial function of T cells in patients with progressive forms of MS, and to identify the regulatory mechanisms underlying the differences observed in different subpopulations of T cells.

RESULTS

53 patients with progressive multiple sclerosis were enrolled (22 patients with PP, 31 SP) at the "Center for demyelinating diseases" of the Neurology Unit of Modena (Nuovo Ospedale Civile Sant'Agostino Estense, Modena).

Twenty healthy subjects matched for age and sex comparable to MS patients were also enrolled.

First of all, we characterized the various subpopulations of T cells in these patients from the phenotypic point of view, observing a general shift towards a more senescent phenotype - that is, with a greater presence of cells that have reached the end of their differentiation process.

To understand if these differences in T cell populations were due to their different ability to proliferate after being activated, we analyzed this function among the T subpopulations, observing a lower proliferation capacity of both CD4+ and CD8+ T cells from patients with PP MS, but not those of patients with SP MS. PP MS patients also showed higher proinflammatory cytokine production (particularly IFN-gamma and IL-17) than SP MS patients and healthy controls.

Then, we wondered whether these differences were due to a different ability to activate the metabolic pathways mentioned above. We focused our attention on CD4+ T cells: we isolated the CD4+ TN cells and effector memory T cells (TEM, which had previously undergone activation) and determined their metabolic activity. In the absence of stimulation, these cells showed low metabolic activity in both patients and controls. When these cells were activated, however, they showed a profoundly different metabolic behavior in SP MS and PP MS.

TN and TEM lymphocytes from PP MS patients showed less use of cellular respiration and higher use of glycolysis compared to patients with SP MS. In addition, the mitochondria of the lymphocytes of these patients ap-

peared smaller and fragmented, less organized from the ultrastructural point of view and with a lower membrane potential. According to this observation, patients with MS PP have a more marked tendency to activate glycolysis in T cells after stimulation. The transcription factors that support respiration and the formation of new mitochondria also appeared less expressed in PP MS patients compared to SP MS patients and controls. Finally, the effector memory T cells from PP patients were characterized by higher levels of glucose transporter -1 (necessary to provide the glucose used in glycolysis) and by a greater expression of genes that support glycolysis compared to patients with MS SP, and healthy subjects.

CONCLUSIONS

Overall, our data suggest that profound differences exist in the phenotypic and metabolic features of T cells from PP and SP patients; in particular, T cells from PP MS patients show a more senescent phenotype, and a clear tendency to activate and maintain active glycolysis after stimulation. Thus, although the two clinical phenotypes are considered part of the same disease spectrum, the mechanisms that lead to either primary or secondary progressive forms are clearly different, at least from the immunometabolic point of view.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

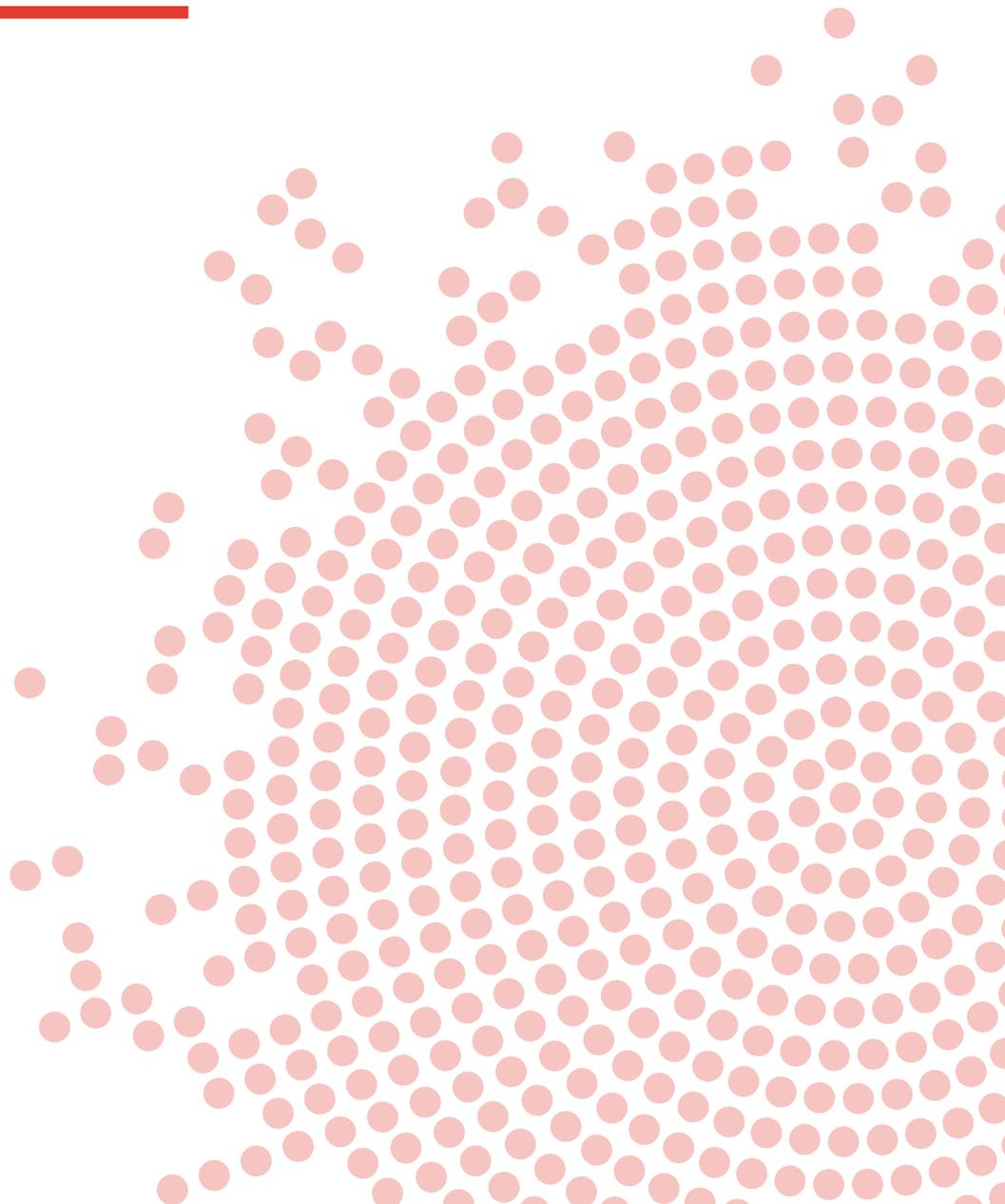
- De Biasi S, Simone AM, Bianchini E, Lo Tartaro D, Pecorini S, Nasi M, Patergnani S, Carnevale G, Gibellini L, Ferraro D, Vitetta, Pinton P, Sola P, Cossarizza A, Pinti M Mitochondrial functionality and metabolism in T cells from progressive multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol* 2019. 49(12), p. 2204-2221
- Ferraro D, Guicciardi C, De Biasi S, Pinti M, Bedin R, Camera V, Vitetta F, Nichelli P, Cossarizza A and Sola P Plasma Neurofilaments correlate with Disability in Progressive Multiple Sclerosis patients. *Acta neurologica Scandinavica*. 141(1), pp. 16-21. 2019
- Bianchini E, De Biasi S, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Simone AM, Ferraro D, Vitetta A, Sola P, Cossarizza A, Pinti M T cells from patients with primary progressive form of multiple sclerosis display altered metabolism and mitochondrial functionality. 11° Congresso nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia Clinica e Allergologia (SIICA). Bari, June 26-28th 2017. Poster
- De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A and Pinti M. T Cells from Patients with Primary Progressive Form of Multiple Sclerosis Display Altered Metabolism and Mitochondrial Functionality. 32° Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO), Boston, USA, June 10-14th 2017. Selected for oral presentation
- De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Lo Tartaro D, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A and Pinti M. Differences between Primary and Secondary Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Lesson from T Cell Subpopulation Metabolism. 33° Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO) Praga, Czech Republic, April 28 - May 2 2018. Selected for oral presentation
- Bianchini E, De Biasi S, Nasi M, Gibellini M, Pecorini S, Lo Tartaro D, De Gaetano A, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A, Pinti M. Impairment of T cell metabolism and phenotype in patients with primary progressive form of multiple sclerosis. 45° annual meeting of the Italian Group of Bioenergetics and Bioemembranes (GIBB). Modena, Italy, June 22nd-25th 2018. Selected for oral presentation
- De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Lo Tartaro D, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A and Pinti M. Differences between Primary and Secondary Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Lesson from T Cell Subpopulation Metabolism. 5° European Congress of Immunology (ECI) Amsterdam, Netherlands, September 2-5th 2018. Selected for oral presentation

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni (prorogato di 2 mesi) e l'ammontare di 155.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 2 years (extended by 2 months) and the amount of € 155,000

Diagnosi e monitoraggio della malattia

Diagnosis and monitoring
of the disease



Targeting terapeutico dell'attività e dell'espressione di REST allo scopo di ridurre la neurodegenerazione e i deficit sinaptici in modelli di EAS cronica



Antonio Uccelli

Dipartimento di Neuroscienze Oftalmologia Genetica e Scienze Materno-infantili (DINOGLI),
Università degli Studi di Genova e Ospedale Policlinico San Martino,
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Genova

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Nicole Kerlero de Rosbo, Valentina Petrosino, Federico Carlini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Fabio Benfenati, Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie del Cervello, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

Il fattore "Repressor element 1-silencing transcription factor" (REST) è una proteina che controlla l'espressione di geni importanti per il mantenimento delle cellule nervose. L'espressione di REST è alterata in diverse malattie neurodegenerative e il nostro studio pilota ha indicato che REST è overespresso nel modello della sclerosi multipla (SM), l'encefalite autoimmune sperimentale (EAS). Di conseguenza, il nostro progetto ha lo scopo di indagare l'overespressione di REST, valutando il suo possibile ruolo come biomarker per la progressione e la risposta al trattamento dei farmaci in uso e modulare la sua attività/espressione per migliorare la malattia.

RISULTATI

L'analisi dell'espressione di REST in fasi rilevanti della malattia in differenti regioni del sistema nervoso centrale (SNC) ha mostrato un'upregolazione di REST nel midollo spinale, associata alla downregolazione dei geni target studiati, come atteso. Al contrario, l'overespressione di REST nello striato è associata, invece, all'upregolazione degli stessi geni target, un'osservazione apparentemente collegata all'upregolazione di REST4, una proteina troncata di REST, che attraverso la competizione con quest'ultimo, permette l'espressione dei geni target di REST. L'analisi del cambiamento dell'espressione di 80 geni target di REST ha mostrato una tendenza alla downregolazione di questi geni nell'EAS, particolarmente nel midollo spinale. Per comprendere quale/i tipi di cellule potrebbero essere

responsabili di questa overespressione, abbiamo localizzato REST in sezioni di tessuto del SNC usando un anticorpo specifico per REST e anticorpi specifici per i diversi tipi cellulari del SNC. Abbiamo osservato che REST è espresso sia in cellule nervose che non, con un chiaro aumento nella proporzione di cellule non nervose coinvolte nell'infiammazione del SNC, nella fase iniziale dell'EAS. Per ottenere alcune informazioni sui meccanismi che accompagnano l'overespressione di REST in queste cellule, abbiamo esposto colture di cellule nervose a un ambiente pro-infiammatorio o a molecole che mimano l'infiammazione nell'EAS e abbiamo analizzato le componenti molecolari che costituiscono i *pathways* del segnale coinvolti nel controllo dell'espressione e dell'attività di REST e REST4. Abbiamo incubato cellule simil-nervose (N2a) con il sopranatante di cellule immunitarie attivate responsabili dell'induzione dell'EAS nei topi, e che secernono molecole infiammatorie cruciali per la generazione dell'ambiente infiammatorio tipico dell'EAS (interferone-gamma, interleuchina-2 etc) e abbiamo osservato in queste cellule un aumento dell'espressione sia di REST che di REST4, sebbene l'aumento di REST4 fosse maggiore di quello di REST, un dato probabilmente associato alla concomitante upregolazione dei geni target di REST in queste condizioni sperimentali. In questo contesto, abbiamo dimostrato che l'aumento di REST4 era supportato da un aumento dell'espressione di una specifica proteina coinvolta nella regolazione delle diverse forme di REST.

Il processo attraverso cui REST regola la differenziazione

ne delle cellule nervose è controllato da diversi *pathways* del segnale, di cui abbiamo analizzato l'espressione o lo stato di attività di alcune sue componenti. In particolare, in condizioni infiammatorie, abbiamo osservato l'attivazione di alcuni *pathways* che portano all'upregolazione di REST e/o una riduzione della loro attività, supportando il ruolo di REST nella neuroinfiammazione. Quando abbiamo esposto le cellule nervose derivanti da topi neonati a uno dei principali mediatori dell'infiammazione, in grado di modulare le alterazioni indotte dall'infiammazione nella struttura e plasticità cerebrale, abbiamo osservato un'upregolazione di REST e possibilmente identificato le conseguenze molecolari e fisiologiche che potrebbero essere alla base della plasticità nervosa in condizioni infiammatorie. Usando topi ingegnerizzati nei quali è stato indotto il *knock-out* del gene codificante per REST nelle cellule nervose, abbiamo osservato una EAS meno severa in questi topi, supportando la nostra ipotesi che REST svolga un ruolo importante nella progressione della malattia.

Di conseguenza, abbiamo valutato come l'espressione di REST possa essere influenzata nei topi malati trattati con farmaci che sono efficaci nell'EAS e che sono attualmente in uso come agenti terapeutici per la SM, in particolare il fingolimod (FTY). Abbiamo osservato che il trattamento efficace con il fingolimod nei topi affetti da EAS è associato a una significativa riduzione dell'overespressione di REST nella fase iniziale di malattia.

CONCLUSIONI

Questi risultati supportano la nostra ipotesi che REST e i meccanismi coinvolti nella regolazione della sua espressione e attività, possono giocare un ruolo importante nei disordini neurodegenerativi, in particolare quelli associati ad infiammazione, come la SM. Inoltre, questi risultati suggeriscono che questo ruolo potrebbe essere successivamente valutato anche nel contesto dello sviluppo di specifiche terapie che hanno come target l'espressione di REST e/o la sua attività.

Therapeutic targeting of REST activity and expression to reduce neurodegeneration and synaptic deficits in chronic EAE

INTRODUCTION AND AIMS

Repressor element 1-silencing transcription factor (REST) is a protein that controls the expression of genes important in the maintenance of nerve cells. REST expression is altered in diverse neurodegenerative diseases and our pilot study had indicated that REST is overexpressed in the model for multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Accordingly, our project aimed at dissecting REST overexpression in EAE, assessing its possible role as a biomarker for disease progression and response to treatment, and modulating its activity/expression to ameliorate disease.

RESULTS

Analysis of REST expression at relevant stages of EAE (acute, peak, and chronic) in different central nervous system (CNS) regions showed upregulation of REST in the spinal cord that was associated with downregulation of its studied target genes, as expected. In contrast, overexpression of REST in the striatum was associated instead with upregulation of the target genes studied, an observation apparently related to the upregulation of REST4, a truncated REST protein which, through competition with REST, enables the expression of REST target genes. Analysis of expression changes for 80 REST-target genes showed a tendency for downregulation of these genes in

EAE, particularly in the spinal cord.

To understand which cell type(s) might be responsible for such overexpression, we localized REST in CNS tissue slices using a specific antibody together with antibodies specific for relevant types of CNS cells. We observed that REST was expressed in both nerve and non-nerve cells, with a clear increase in the proportion of REST-expressing non-nerve cells involved in CNS inflammation, at the early phase of EAE.

To gain some insight into the mechanisms triggering REST overexpression in the cells, we exposed nerve cell cultures to a pro-inflammatory milieu or molecules that mimic the inflammatory environment of EAE, and analyzed the molecular components that constitute the pathways involved in controlling the activity or expression of REST and REST4. We incubated nerve cell-like immortalized N2a cells with the supernatant of activated immune cells responsible for inducing EAE in mice, and which secrete inflammatory molecules crucial for the generation of the inflammatory environment in EAE (interferon-gamma, interleukin-2, etc.) and observed an increase in expression of both REST and REST4 in these cells, albeit to a greater extent for REST4, a data seemingly commensurate with the concomitant upregulation of the REST target genes under these conditions. In this context, we showed that the upregulation of REST4 was corroborated by an in-

crease in the expression of a specific protein involved in regulating the REST molecules. The process through which REST regulates nerve cell differentiation is orchestrated by several pathways, of which components we have assessed the expression and/or status. In particular, under inflammatory conditions, we observed the activation of several pathways that conduce to REST upregulation and/or decrease its activity and support the role of REST in neuroinflammation. When we exposed nerve cells derived from neonate mice to one of the most important protein mediators of inflammation, which modulates inflammation-induced alterations in brain plasticity and structure, we observed an upregulation of REST and could identify its molecular and physiological consequences that underlie nerve plasticity under inflammatory conditions. Using genetically engineered mice in which the gene encoding REST was knocked-out in nerve cells, we observed a less severe EAE in these mice, commensurate with our

contention that REST plays a role in disease progression. Accordingly, we evaluated how REST expression is affected in sick mice treated with drugs that are effective in EAE and are currently being used as therapeutic agents in MS, in particular fingolimod (FTY). We observed that the effective treatment of EAE-affected mice with fingolimod was associated with a significant reduction in the overexpression of REST at the early phase of disease.

CONCLUSIONS

These findings support our hypothesis that REST and the mechanisms that are involved in regulating its expression and activity can play a major role in neurodegenerative disease, in particular associated with inflammation, such as MS, and suggest that such a role could be further assessed in the context of developing specific therapies that target its expression and/or activity.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Analysis of REST expression in a mouse model of multiple sclerosis. XXV Congress AINI, 11-15 May 2016, Lecce, Italy
- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Dysregulation of Repressor Element 1-Silencing Transcription factor in a mouse model of multiple sclerosis. 32nd congress of the European Committee for Treatment and Research In Multiple Sclerosis,ECTRIMS, 14-17 September 2016, London, UK
- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Dysregulation of Repressor Element 1-Silencing Transcription factor in a mouse model of multiple sclerosis. 13th International Congress of Neuroimmunology, ISNI, 26-29 September 2016, Jerusalem, Israel
- Benfenati, F. Modulation of neural activity with light: bases and applications of optogenetics. Pirelli Lecture, International Brain Awareness Week. March 14, 2016. IRCCS Mondino Pavia, Italy
- Benfenati, F. New technologies for the central nervous system. Invited Lecture, Science and Philosophy Series (XVIII edition). May 12, 2016, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy
- Benfenati, F. Physiological role and optogenetic modulation of the transcription factor REST/NSRF in the nervous system. Invited Lecture, December 14, 2016. Dunn School, Oxford University, UK
- Gatti lou M, Criscuolo S, Maragliano L, Cesca F, Benfenati F. Translational regulation of RE1 silencing transcription factor (REST) using a synthetic RNA binding protein approach. Poster presentation. 2016 meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA
- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Dysregulation of Repressor Element 1-Silencing Transcription factor in a mouse model of multiple sclerosis. Poster presentation. XIth Congress of the Italian Society of immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA). May 28-31, 2017. Bari, Italy
- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Dysregulation of Repressor Element 1-Silencing Transcription factor in a mouse model of multiple sclerosis. Oral presentation. 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, (ESCI). May 17-19, 2017. Genova, Italy
- Buffolo F, Petrosino V, Cesca F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Benfenati F. Therapeutic targeting of REST activity and expression to reduce neurodegeneration and synaptic deficits in chronic EAE. Poster presentation. ESM 2017 meeting, Milan, Italy
- Buffolo F, Petrosino V, Cesca F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Benfenati F. In vitro and in vivo characterization of REST activity and expression under neuroinflammatory conditions. Poster presentation. EMBO Workshop Microglia 2018, Heidelberg, Germany
- Buffolo F, Petrosino V, Cesca F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Benfenati F. In vitro and in vivo characterization of REST activity and expression under neuroinflammatory conditions. Poster presentation. Munich Life Science Symposium, Interact 2018, Munich, Germany
- Petrosino V, Criscuolo S., Buffolo F., Cesca F., Benfenati F., Kerlero de Rosbo N., Uccelli A. Therapeutic targeting of REST activity and expression to reduce neurodegeneration and synaptic deficits in chronic EAE. Poster presentation. 1st BraYn Conference, June 29-30 2018, Genova, Italy
- Petrosino V, Criscuolo S, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Possible involvement of the Repressor Element 1-Silencing Transcription factor in the pathological process of experimental autoimmune encephalomyelitis. Oral presentation, XXVII AINI Congress, May 7-10 2018, Trieste, Italy.
- Buffolo, F, Petrosino, V, Cesca, F, Kerlero de Rosbo, N, Uccelli, A, and Benfenati, F. In vitro and in vivo characterization of REST activity and expression under neuroinflammatory conditions. Poster presentation. 1st BraYn Conference, June 29-30 2018, Genova, Italy
- Buffolo, F, Petrosino, V, Cesca, F, Kerlero de Rosbo, N, Uccelli, A., Benfenati, F. In vitro and in vivo characterization of REST activity and expression under neuroinflammatory conditions. Poster presentation. 11th FENS Forum of Neuroscience, July 7-11 2018, Berlin, Germany
- Petrosino V, Buffolo F, Cesca F, Benfenati F, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Molecular mechanism underlying REST dysregulation in the experimental autoimmune encephalomyelitis. Oral presentation, XXVIII AINI Congress, May 6-9 2019, Camogli, Italy
- Carlini F, Petrosino V, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Ex vivo assessment of the effect of fingolimod on new pathways involved in neuroprotection. Poster presentation, XXVIII AINI Congress, May 6-9 2019, Camogli, Italy
- Carlini F, Petrosino V, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Modulation of REST and galectin expression induced by fingolimod treatment during EAE. Poster presentation, 2nd BraYn Conference, November 14-16 2019, Milan, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 235.000 €
Research project funded by FISM Grant 2016) for the period of 3 years and the amount of € 235,000

Marcatori biologici per monitorare demielinizzazione e rimielinizzazione



Lucilla Nobbio

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI), Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Davide Visigalli, Giovanna Capodivento, Luca Bollo, Lorenzo Brunetto, Elisabetta Capello, Gianluigi Mancardi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Giovanni Ferrara, Valentina Petrosino, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, UO26, Genova

Andrea Armirotti, Abdul Basit, Zeeshan Hamid, Laboratorio di Chimica Analitica, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova

Daniela Marubbi, Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Elisa Zanier, Dipartimento di Neuroscienze, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

Matilde Inglese, Icahn School of Medicine, Mount Sinai, New York, USA & DINOEMI, Università degli Studi di Genova, Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

Demielinizzazione e rimielinizzazione sono processi di estremo interesse per i ricercatori che si occupano di patologie della mielina. In particolare, l'identificazione di marcatori biologici in grado di monitorare i cambiamenti della guaina mielinica faciliterebbe la gestione dei pazienti con sclerosi multipla (SM), consentendone una migliore classificazione, il fine monitoraggio della progressione della malattia e la scelta e lo studio degli effetti di molecole capaci di promuovere rimielinizzazione. In altre patologie, come le neuropatie demielinizzanti immunomediate, abbiamo dimostrato che la sfingomielina, uno sfingolipide essenziale per la struttura e funzione della mielina, è estremamente aumentato nel liquor dei pazienti affetti rispetto a pazienti con patologie non demielinizzanti, e correla con l'attività di malattia e con le principali scale cliniche utilizzate per monitorare queste patologie, candidandosi a nuovo biomarcatore umorale diagnostico e prognostico. Pertanto, in questo progetto abbiamo studia-

to se sfingomielina e altri sfingolipidi possano effettivamente avere la stessa valenza anche nel SNC utilizzando modelli murini sia di danno mielinico centrale che di SM e verificando le nostre osservazioni in pazienti con diverse forme di SM. Inoltre, abbiamo studiato se il metabolismo degli sfingolipidi di per sé possa contribuire a una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono questa patologia.

RISULTATI

Poiché obiettivo principale del nostro progetto era l'identificazione di biomarcatori lipidici in grado di monitorare demielinizzazione e rimielinizzazione abbiamo inizialmente utilizzato il modello murino da ingestione di cuprizone analizzandone, mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione i livelli di sfingolipidi nel liquor, siero e omogenato di corpo calloso. Questo ci ha consentito di dimostrare che l'intero *pathway* degli sfingolipidi è alterato in corso di demielinizzazione e che tutte le sfingomieline e

alcune specie di sfingolipidi sono in grado di monitorare la perdita di mielina e il suo recupero sia a livello tissutale che nei fluidi biologici. Abbiamo quindi esteso lo stesso tipo di analisi al modello di encefalomyelitis sperimentale autoimmune (ESA) come modello murino della patologia umana, quantificando gli sfingolipidi nel liquor, siero e omogenato di midollo spinale. Come atteso, il profilo degli sfingolipidi è risultato diverso rispetto a quello ottenuto nel modello di ingestione da cuprizone nel quale il contributo dell'infiammazione è trascurabile. In particolare, abbiamo trovato che un numero limitato di sfingolipidi è alterato nel modello ESA in fase acuta e correla con la gravità del fenotipo, suggerendone un potenziale ruolo come biomarcatori di malattia. Per approfondire questi risultati e per distinguere eventualmente il ruolo degli sfingolipidi nell'infiammazione da quello nella demielinizzazione abbiamo trattato il modello ESA in fase acuta con benztropina, una molecola con proprietà rimielinizzanti e scarsa interferenza sull'infiammazione. Questo esperimento ci ha consentito di selezionare effettivamente poche specie di sfingolipidi capaci di monitorare in modo affidabile demielinizzazione e rimielinizzazione piuttosto che infiammazione. Per sostenere ulteriormente l'importanza di queste specie di sfingolipidi abbiamo analizzato i livelli di espressione di geni codificanti enzimi fondamentali per il loro metabolismo dimostrandone una coerente alterazione. Infine, per traslare tali risultati ai pazienti umani, abbiamo studiato i livelli di sfingolipidi

nel liquor e siero di 48 pazienti affetti da diverse forme di SM (sindrome clinicamente isolata, sclerosi multipla recidivante-remittente, sclerosi multipla primariamente e secondariamente progressiva) e 18 pazienti affetti da altre patologie non demielinizzanti utilizzati come controlli. Abbiamo trovato che la sfingomielina sierica riconosce i pazienti affetti dalle diverse forme di SM rispetto ai controlli e correla con la gravità clinica nel liquor degli stessi pazienti. Inoltre, i nostri studi ci hanno consentito di dimostrare un notevole aumento di ceramidi e hexosylceramidi sia nel liquor che nel siero dei pazienti affetti da SM. In particolare, questi metaboliti si sono dimostrati utili nel differenziare le diverse forme di malattia.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha fornito nuove informazioni sulle funzioni esercitate dagli sfingolipidi nei processi di infiammazione e demielinizzazione utili a una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella SM. Inoltre, gli studi approfonditi sui modelli sperimentali e sui pazienti con SM hanno consentito di individuare fra tutti gli sfingolipidi quelli associati all'infiammazione rispetto a quelli in grado di monitorare i cambiamenti della membrana mielinica. Questo studio potrebbe pertanto rappresentare una base solida per analizzare la potenza dei metaboliti lipidici identificati come biomarcatori di malattia in una popolazione ben selezionata di pazienti affetti da SM in tutte le sue varianti.

Biomarkers to monitor demyelination and remyelination

INTRODUCTION AND AIMS

Demyelination and remyelination are major issues for physicians working on myelin disorders. Indeed, the identification of de-remyelination biomarkers specific and sensitive to monitor disease progression and myelin remodeling, to test putative pro-remyelinating compounds and thereby select specific treatments is a prime goal within the multiple sclerosis (MS) community. In other demyelinating disorders, namely acquired immune-mediated neuropathies, we recently demonstrated that cerebrospinal fluid levels of sphingomyelin, a major lipid component of the myelin membrane, are extremely increased compared to non-demyelinating diseases; actually sphingomyelin levels also correlate with disease activity, and clinical outcome measures, disclosing this lipid dosage as a reliable biomarker to improve the clinical management of these patients. In the present study we investigated whether

sphingomyelin and other sphingolipids may reliably play the same role also in the CNS, using murine models of both myelin damage and MS, and translating our results to patients with different types of the disease. Moreover, we also investigated whether a deeper knowledge of sphingolipid metabolism may be helpful to understand the molecular mechanisms underlying MS.

RESULTS

To monitor demyelination and remyelination in a highly reproducible context, we paralleled sphingolipid dosage by sphingolipid-targeted high-resolution mass spectrometry in cerebrospinal fluid (CSF), serum and corpus callosum of the cuprizone-fed mouse with neuropathology at different time points during the myelin loss and recovery stages. We found that the entire sphingolipid pathway was compromised during demyelination. Interestingly, sphin-

gomyelins and other sphingolipids were able to follow demyelination and remyelination both in the tissue and in biological fluids. To support our issue, we extended sphingolipid profiling to the EAE mouse, mainly because EAE is the most frequently used animal model for human MS. As expected, these studies showed that the overall sphingolipid pattern of expression does not overlap with the one we found in the cuprizone model, where the contribution of inflammation is negligible. Actually, we found that just a limited number of sphingolipid species was altered both in the spinal cord and biological fluids of the EAE mice during the acute phase of the disease and their levels correlated with disease severity, suggesting a role of disease biomarkers. To eventually distinguish the role of sphingolipid pathway in inflammation and demyelination, we treated EAE mice during the acute phase of the disease with benztropine, a well-proven remyelinating compound, which does not interfere with inflammation. This experiment allowed us to find few sphingolipid species able to monitor demyelination and remyelination rather than inflammation. To further strengthen these results, a molecular profiling of key enzymes responsible for sphingolipid metabolism showed a correspondent alteration in the expression of genes involved in biosynthesis and recycling of these few sphingolipids. To translate the results obtained from the experimental models to human patients, we profiled sphingolipids in the CSF and serum of 48 patients affected by different MS types including isolated clinical syndrome (CIS), relapsing-remitting MS (RR-MS), primary and secondary progressive MS (Pr-MS) and 18 patients affected by other neurological diseases, which we used as

controls. Since, a clinically acceptable biomarker is highly needed in the MS research community, we firstly used our sphingomyelin patented fluorescent-based assay to test whether total sphingomyelin dosage can be used for this purpose. We found that sphingomyelin recognizes MS patients (CIS, RRMS, and PrMS) from controls in serum samples and correlates with EDSS in CSF samples. Indeed, these results were also validated by mass spectrometry data in which specific sphingomyelins also positively correlate with EDSS. Actually, this latter analysis allowed also to demonstrate in the CSF and serum of MS patients a highly significant and reliable increase of ceramides and hexosylceramides compared to control subjects. Notably, these lipid metabolites were also able to distinguish the different types of MS, assuming thereby significance as promising biomarkers.

CONCLUSIONS

Overall, the studies performed on the animal models and patients with MS have provided insights into the critical role operated by sphingolipid metabolism in inflammation and demyelination. In fact, through the comprehensive lipidomics performed on tissue and biological fluids we have obtained novel information about the specific sphingolipid metabolites mainly responsible for these two critical aspects of the disease. Since the overall objective of the project was the identification of potential biomarkers to monitor demyelination and remyelination, we are confident that our results represent a further step toward this direction.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

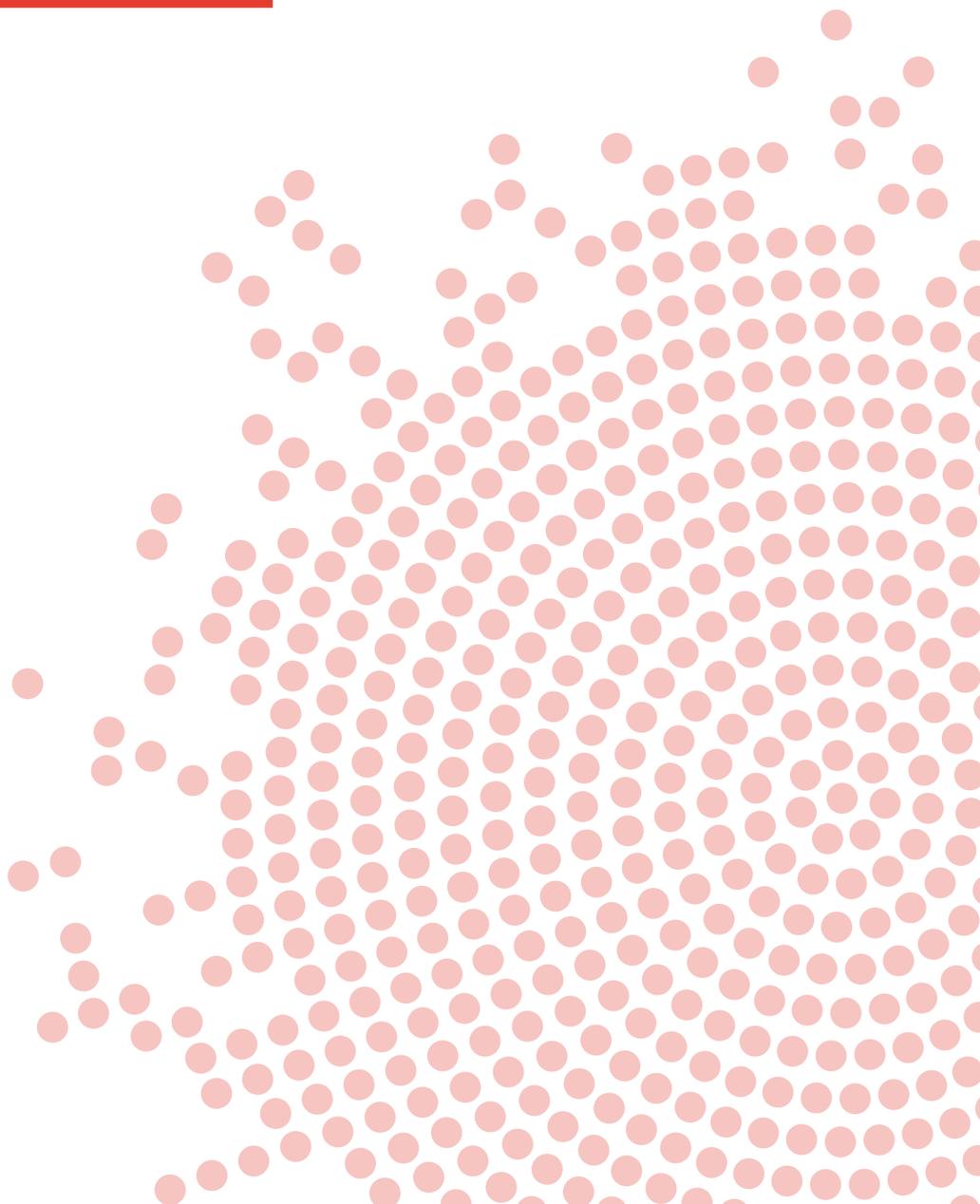
- Capodivento G, Visigalli D, Garnero M, Fancellu R, Ferrara MD, Basit A, Hamid Z, Pastore VP, Garibaldi S, Armirotti A, Mancardi G, Serrati C, Capello E, Schenone A, Nobbio L. Sphingomyelin as a myelin biomarker in CSF of acquired demyelinating neuropathies. *Sci Rep*. 2017 Aug 10;7(1):7831
- Fornasari BE, Ronchi G, Pascal D, Visigalli D, Capodivento G, Nobbio L, Perroteau I, Schenone A, Geuna S, Gambarotta G. Soluble Neuregulin1 is strongly up-regulated in the rat model of Charcot-Marie-Tooth 1A disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Feb;243(4):370-374
- Visigalli D, Capodivento G, Basit A, Fernández R, Hamid Z, Pencová B, Gemelli C, Marubbi D, Luoma AM, Riekel C, Kirschner DA, Schenone A, Fernández JA, Armirotti A, Nobbio L. Exploiting sphingo- and glycerophospholipid impairment to select effective drugs and biomarkers for CM-T1A. Submitted, February, 2020
- Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Hamid Z, Petrosino V, Basit A, Marubbi D, Bollo L, Brunetto L, Schenone A, Uccelli A, Capello E, Mancardi G, Armirotti A, Nobbio L. Sphingolipid profiling reveals candidate biomarkers for demyelination and remyelination in multiple sclerosis. Manuscript in preparation
- Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Hamid Z, Petrosino V, Basit A, Marubbi D, Bollo L, Brunetto L, Schenone A, Uccelli A, Capello E, Mancardi G, Armirotti A, Nobbio L. Biomarkers to monitor demyelination and remyelination. Annual Meeting della Rete IRCCS delle Neuroscienze e della Neuroriabilitazione. Ospedale IRCCS San Raffaele, Milan, March 24-25th, 2020
- Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Hamid Z, Petrosino V, Basit A, Marubbi D, Brunetto L, Schenone A, Uccelli A, Capello E, Mancardi G, Armirotti A, Nobbio L. Sphingolipid alerts to distinguish inflammation from demyelination in multiple sclerosis. AINI. Camogli, May 6-9th, 2019
- Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Hamid Z, Petrosino V, Basit A, Marubbi D, Brunetto L, Schenone A, Uccelli A, Capello E, Mancardi G, Armirotti A, Nobbio L. Biomarkers to monitor demyelination and remyelination. Congresso Scientifico Annuale AISM e sua Fondazione. Rome, May 29th-31st, 2019
- Visigalli D, Capodivento G, Ferrara G, Petrosino V, Basit A, Hamid Z, Armirotti A, Nobbio L. Biomarkers to monitor myelin loss and remodeling. Brayn Conference. Genova, 29-30 Giugno 2018
- Nobbio L, Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Petrosino V, Basit A, Hamid Z, Bollo L, Armirotti A, Schenone A, Mancardi G. Biomarkers to monitor demyelination and remyelination. Congresso Scientifico Annuale AISM e sua Fondazione. Rome, May 28-30, 2018
- Nobbio L, Visigalli D, Ferrara G, Capodivento G, Petrosino V, Basit A, Hamid Z, Bollo L, Armirotti A, Schenone A, Mancardi G. Biomarkers to monitor demyelination and remyelination. Congresso Scientifico Annuale AISM e sua Fondazione. Rome, May 29th-31st, 2017
- Visigalli D, Capodivento G, Ferrara G, Petrosino V, Basit A, Hamid Z, Armirotti A, Nobbio L. Biomarkers to monitor myelin loss and remodeling. 2nd IMaSS Network. Genoa, June 29-30th, 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 111.350 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 12 months) and the amount of € 111,350

Verso nuovi trattamenti

Towards new
treatments



Elucidazione del ruolo di BAFF e della sua via immuno-patogenetica nell'insorgenza della sclerosi multipla e utilizzo dell'avanzamento in conoscenza per lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci



Francesco Cucca

Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Monserrato (CA)

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Maristella Steri, Edoardo Fiorillo, Valeria Orrù, Maria Laura Idda, Mauro Pala, Stefania Olla, Magdalena Zoledziewska, Matteo Floris, Maristella Pitzalis, Manila Deiana

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

David Schlessinger, Myriam Gorospe National Institute on Aging, NIH, Bethesda, Maryland, USA

Francesca Fallarino, Università degli Studi di Perugia, Perugia

PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto proponeva di combinare la genomica funzionale con moderni approcci di drug design. Precedentemente abbiamo individuato un'associazione tra SM e una variante nel gene *TNFSF13B*. Questo gene codifica la citochina BAFF che ha un ruolo chiave nella regolazione delle cellule B. Abbiamo dimostrato che la variante associata al rischio di SM BAFF-var allo stesso tempo aumenta i livelli circolanti di BAFF solubile (sBAFF), di linfociti B, di immunoglobuline e riduce il numero di monociti. La variante è localizzata nel 3'UTR di *TNFSF13B*, ed è comune in Sardegna ma è rara altrove. La variante crea un nuovo sito di poliadenilazione che determina il rilascio di un trascritto più breve. Questa osservazione suggerisce che il trascritto breve viene tradotto in maniera più efficiente in quanto la 3'UTR corta mancherebbe dei siti inibitori di controllo per microRNAs. L'obiettivo principale di questo progetto era comprendere il meccanismo di controllo post-trascrizionale di BAFF e conoscere in dettaglio conseguenti eventi cellulari e fisiologici implicati, mediante cinque obiettivi specifici: i) identificare i meccanismi post-trascrizionali che regolano l'espressione di BAFF; ii) caratterizzare specifici sottotipi di cellule B e monociti coinvolti nelle vie di regolazione di BAFF; iii) identificare le sottoclassi di immunoglobuline associate alla variante predisponente di BAFF; iv) identificare mediante studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) nuove associazioni coincidenti

tra la SM i fenotipi cellulari e umorali già caratterizzati su 4mila individui, per determinare quelli aventi impatto causale nella SM; v) identificare, *in silico*, piccole molecole in grado di modulare BAFF, e sviluppare saggi specifici su cui testare i composti selezionati.

RISULTATI

Abbiamo studiato i meccanismi di controllo post trascrizionale di BAFF eseguendo studi di espressione in linee cellulari e abbiamo mostrato che BAFF-var aumenta i livelli di sBAFF favorendo la produzione di un trascritto più corto che, perdendo siti di inibizione, viene represso con minor forza dalla cooperazione del miRNA-15a e della proteina legante RNA (RBP) NF90.

Abbiamo analizzato, mediante GWAS, specifiche sottopopolazioni di cellule B, monociti e livelli di immunoglobuline. Abbiamo stabilito che l'effetto di BAFF-var sulle cellule B e sui monociti è molto generale. Inoltre BAFF-var è stata associata principalmente con le immunoglobuline IgG1, ma anche con le IgA e le IgM.

Nel complesso, questi risultati indicano BAFF come bersaglio terapeutico nella SM, oltre che per la terapia del Lupus Eritematoso Sistemico.

Per identificare piccole molecole capaci di modulare sBAFF, abbiamo ideato e applicato un approccio di Screening Virtuale, partendo da database commerciali di ≈ 276 mila molecole. Di queste, solo 218 presentano le

caratteristiche chimico-fisiche per legarsi a sBAFF e sono state selezionate come potenziali farmaci per uso orale da validare con test *in vitro*. Tutti i composti sono stati testati a singola concentrazione 30uM in un saggio primario. Successivamente, è stata generata una linea cellulare stabile che risponde a sBAFF per validare i composti attivi identificati nello screening primario. Otto composti hanno mostrato attività inibitoria di BAFF e assenza di tossicità nel test primario, e sono stati quindi oggetto di un test di follow-up. Solo due composti hanno mostrato attività inibitoria alle concentrazioni di 30 uM e 10 uM.

Per identificare i tratti immunitari associati alla SM, abbiamo eseguito il GWAS su circa mille tratti immunologici, misurati in 4mila volontari. Oltre a BAFF-var, abbiamo trovato sette associazioni non-MHC indipendenti e coincidenti con il rischio di SM, che indicano tratti immunitari potenzialmente coinvolti nella SM, sia tra i sottotipi di cellule B che T. I risultati di questo progetto mostrano la potenza degli studi genetici nel chiarire le basi patogenetiche della SM, contribuendo a generare nuove e più specifiche terapie. I risultati sono coerenti con gli obiettivi proposti nel progetto.

CONCLUSIONI

BAFF-var è il primo esempio di variante di rischio nella SM che mostra associazione coincidente con immuno-fenotipi nel nostro studio. Abbiamo contribuito a chiarire i meccanismi post-trascrizionali e identificato il coinvolgimento di specifici sottotipi di cellule B e immunoglobuline nella SM, che tuttavia richiedono ulteriori approfondimenti. I nostri risultati hanno importanti implicazioni nella ricerca clinica: i pazienti con genotipo BAFF-var potrebbero mostrare un beneficio differenziale dalle terapie anti-BAFF, o potrebbero rispondere peggio alle terapie di deplezione delle cellule B a causa di una più rapida ricomparsa delle cellule B della memoria.

Nel complesso, i nostri risultati indicano BAFF come bersaglio terapeutico nella SM e abbiamo validato due composti utili nel modulare BAFF. Abbiamo anche identificato altre sette associazioni coincidenti tra SM e tratti quantitativi, che coinvolgono specifici tipi di cellule immunitarie. Ciò potrà aiutarci sia a rifinire gli effetti di BAFF-var nella SM che a identificare nuovi bersagli terapeutici.

Dissection of the BAFF pathway in multiple sclerosis with a view toward more specific and effective therapies

INTRODUCTION AND AIMS

This project proposed to combine functional genomics with modern drug design methods. With a previous FISM grant, we identified an association between MS and a variant in the *TNFSF13B* gene, which encodes BAFF, a key cytokine for the regulation of B cells. We showed that the same variant associated with MS BAFF-var risk was also significantly associated with increased levels of circulating BAFF (sBAFF), B lymphocytes and immunoglobulins and reduced levels of monocytes. The causal variant (BAFF-var), common in Sardinia but rather rare elsewhere, lies in the 3'UTR of *TNFSF13B* and creates a novel polyadenylation site resulting in a shorter transcript. This suggests possible mechanisms in which the shorter transcript is more efficiently translated because it would lack an inhibitory control site for microRNA(s). The main goal of this project was to analyse the post-transcriptional control mechanism of BAFF and to know more in detail the consequent cellular and physiological events involved, through five specific objectives: (i) to identify the post-transcriptional mechanisms regulating BAFF expression; (ii) to characterize the specific B cell and monocyte subsets implicated in BAFF-associated pathway(s); (iii) to identify the immunoglobulin subclasses most affected and associated with the predisposing BAFF

variant; iv) to perform genome wide association studies (GWAS) on the many cellular and humoral traits assessed on 4 thousands samples, to detect novel coincident associations with MS and any of those traits associated with *TNFSF13B*, in order to support their causal role in MS; v) to identify, *in silico*, small molecules able to modulate BAFF, and to develop specific cell-based assays and test the selected compounds.

RESULTS

We analysed the post-transcriptional control mechanism of BAFF by performing expression studies in different cell lines, and showed that BAFF-var raises sBAFF levels by favoring the production of a shorter transcript that is less inhibited by the cooperation of the miRNA-15a and the RNA binding protein (RBP) NF90.

In parallel, we analysed, by genome wide association studies (GWAS), specific B cell and monocyte subpopulations, and immunoglobulin levels. We found that BAFF-var effects on B cells and monocytes are broad. Among immunoglobulins, BAFF-var was associated mainly with IgG1, but also with IgA and IgM.

Overall, these results indicate BAFF as therapeutic target in MS in addition to be a target for SLE therapy.

To identify small molecules able to modulate sBAFF, we applied a Virtual Screening approach, starting from $\approx 276,000$ small molecules included in commercial databases. Only 218 molecules have the physical-chemical characteristics to bind to sBAFF, possess the features to become drugs for oral use and have been selected for *in vitro* testing. All 218 compounds have been tested at single concentration of 30 μ M with a primary screening. Subsequently, a stable cell line responding to sBAFF have been generated to validate and confirm the active compounds identified in the primary screening.

Eight compounds showed BAFF inhibition activity and absence of toxicity in the primary test, and were tested in a follow-up assay. Only two compounds showed activity at 30 μ M and 10 μ M.

To link immune traits with MS, we performed GWAS on about 1,000 immuno-phenotypes measured on 4,000 volunteers. In addition to BAFF-var, we found seven independent non-MHC coincident associations with MS risk pointing to immune traits potentially involved in MS, either specific B and T cell subtypes.

The results of this project show the potential of genetic studies to dissect the pathogenic bases of MS, contributing

to generate novel, more specific therapies. The results are consistent with the objectives proposed in the project.

CONCLUSIONS

BAFF is the first example of MS risk variant showing coincident association with immune-related traits in our study. We have clarified the post-transcriptional mechanisms and identified the involvement of specific B-cell and immunoglobulin subtypes in MS pathogenesis remaining unclear and requiring further explication. Our results have important implications for clinical research: patients with BAFF-var genotype might show differential benefit from anti-BAFF therapies, or they may respond more poorly to B-cell depletion therapies due to a faster resurgence of memory B cells.

Overall, our results indicate BAFF as therapeutic target in MS and we selected eight validated compounds able to modulate BAFF. We also identified seven additional coincident associations with MS and quantitative traits, involving specific immune cell types. These additional associations help either in refining BAFF-var effects in MS and also in identifying new druggable targets.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, Sidore C, Faà V, Floris M, Deiana M, Asunis I, Porcu E, Mulas A, Piras MG, Lobina M, Lai S, Marongiu M, Serra V, Marongiu M, Sole G, Busonero F, Maschio A, Cusano R, Cuccuru G, Deidda F, Poddie F, Farina G, Dei M, Viridis F, Olla S, Satta MA, Pani M, Delitala A, Cocco E, Frau J, Coghe G, Lorefice L, Fenu G, Ferrigno P, Ban M, Barizzone N, Leone M, Guerini FR, Piga M, Firinu D, Kockum I, Lima Bomfim I, Olsson T, Alfredsson L, Suarez A, Carreira PE, Castillo-Palma MJ, Marcus JH, Congia M, Angius A, Melis M, Gonzalez A, Alarcón Riquelme ME, da Silva BM, Marchini M, Danieli MG, Del Giacco S, Mathieu A, Pani A, Montgomery SB, Rosati G, Hillert J, Sawcer S, D'Alfonso S, Todd JA, Novembre J, Abecasis GR, Whalen MB, Marrosu MG, Meloni A, Sanna S, Gorospe M, Schlessinger D, Fiorillo E, Zoledziewska M, Cucca F. Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med.* 2017 Apr 27;376(17):1615-1626. doi: 10.1056/NEJMoa1610528. PubMed PMID: 28445677
- Floris M, Olla S, Schlessinger D, Cucca F. Genetic-Driven Druggable Target Identification and Validation. *Trends Genet.* 2018 Jul;34(7):558-570. doi: 10.1016/j.tig.2018.04.004. Epub 2018 May 23. Review. PubMed PMID: 29803319; PubMed Central PMCID: PMC6088790
- Idda ML, Lodde V, McClusky WG, Martindale JL, Yang X, Munk R, Steri M, Orrù V, Mulas A, Cucca F, Abdelmohsen K, Gorospe M. Cooperative translational control of polymorphic BAFF by NF90 and miR-15a. *Nucleic Acids Res.* 2018 Dec 14;46(22):12040-12051. doi: 10.1093/nar/gky866. PubMed PMID: 30272251; PubMed Central PMCID: PMC6294513
- Orrù V., Steri M., Sidore C., Marongiu M., Serra V, Olla S, Sole G, Lai S, Dei M., Mulas A., Viridis F., Piras MG., Lobina M., Marongiu M., Pitzalis M., Deidda F., Loizedda A., Onano S., Zoledziewska M., Sawcer S., Devoto M., Gorospe M. 6, Abecasis G. R., Floris M. Pala M., Schlessinger D., Fiorillo E., Cucca F. Complex immune cell genetic signatures that underlie autoimmunity and inform therapy. *Nature Genetics, in revision*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 240.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 240,000

Visualizzazione simultanea di linfociti T e B mediante in vivo RM in un modello murino di sclerosi multipla: implicazioni nella patogenesi e nel trattamento terapeutico



Enzo Terreno

Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute, Università degli Studi di Torino, Torino

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Francesca Garello, Rachele Stefania, Valeria Bitonto

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Marina Maria Boido, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, Università degli Studi di Torino, Torino

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica del sistema nervoso centrale (SNC), associata a diversi processi patologici tra cui neuroinfiammazione, demielinizzazione e danno assonale. I linfociti T sono considerati le "cellule chiave" della risposta immunitaria nella SM, dove contribuiscono alla patogenesi della malattia. Tuttavia, anche altre cellule immunitarie (come i linfociti B) sembrano essere coinvolte nell'insorgenza della malattia. Il rilevamento *in vivo* del reclutamento di cellule immunitarie nel SNC fornirebbe informazioni chiave per l'attivazione/migrazione spazio-temporale di queste cellule e potrebbe chiarire il loro ruolo nello sviluppo e nella progressione della patologia. La risonanza magnetica per immagini (RM) è una tecnica molto adatta per tracciare fenotipi cellulari *in vivo*. L'obiettivo primario di questo progetto è quello di marcare i linfociti T e B *in vivo* utilizzando due agenti di risonanza magnetica di dimensioni nanometriche e tracciando le cellule marcate in un modello murino di SM (ESA).

Per visualizzare i due fenotipi cellulari, sono stati progettati due nanoagenti capaci di generare modalità di contrasto diverse come il contrasto pesato sul T1 e quello basato sul fluoro. I due nanosistemi sono stati coniugati con anticorpi contro i recettori CD4 (per le cellule T) o CD20 (per le cellule B). Una volta marcate, le cellule potranno fornire in tempo reale informazioni sul traffico dei linfociti, sui loro tempi di attivazione e sulle interazioni reciproche nel SNC.

RISULTATI

Poiché il progetto originale di 3 anni è stato declassato a progetto pilota di un anno, gli obiettivi della ricerca sono stati rivisti e limitati agli esperimenti *in vitro*.

Il primo passo dell'attività è stata la sintesi di un fosfolipide opportunamente modificato per rendere possibile l'esposizione degli anticorpi sulla superficie esterna delle nanoparticelle.

Successivamente, sono stati preparati due tipi di nanoparticelle in grado di generare un diverso contrasto RM e legarsi specificamente ai linfociti B o T.

Il primo nanoagente è un liposoma caricato con un complesso di Gd(III) anfifilico e decorato con un anticorpo anti-CD20 per la marcatura dei linfociti B. Questo sistema, denominato Gd-LIPO-CD20, è in grado di generare un contrasto MRI pesato sul T1 in virtù dei centri metallici paramagnetici incorporati nella membrana dei liposomi. Il secondo nanosistema è una nanoemulsione fluorurata composta da un etere corona perfluorurato e decorata con un anticorpo anti CD4 per la marcatura dei linfociti T. Questo agente, chiamato F-NE-CD4, può essere rilevato dalla risonanza magnetica basata sul fluoro.

Le prestazioni dei due nanosistemi sono state valutate *in vitro* attraverso la loro capacità di essere riconosciuti dalle popolazioni cellulari corrispondenti. Gd-LIPO-CD20 è stato testato sulle cellule A20 (CD20-positivo) e gli esperimenti di microscopia FACS o confocale hanno rivelato

un'elevata specificità del nanosistema verso le cellule selezionate.

A causa dell'indisponibilità di una linea cellulare immortalizzata CD4-positiva, la valutazione delle prestazioni di F-NE-CD4 è stata effettuata sulle cellule del sangue di topi sani che sono state anche trattate con Gd-LIPO-CD20. I risultati ottenuti hanno mostrato una marcata avidità di F-NE-CD4 verso i linfociti T, mentre solo una quantità trascurabile di Gd-Lipo-CD20 è stata assorbita da questa popolazione di cellule. Nessun assorbimento di F-NE-CD4 è invece stato rilevato nei linfociti B positivi al CD20, mentre il Gd-LIPO-CD20 non ha mostrato un apprezzabile legame a causa della mancanza di espressione di questo recettore nelle cellule immunitarie del sangue sano. Per questo motivo, l'affinità del Gd-Lipo-CD20 verso le cellule del sangue è stata valutata su un modello murino di sclerosi laterale amiotrofica (SLA), dove è stata determinata una buona marcatura del linfocita B con Gd-Lipo-CD20. Infine, la rilevabilità RM dei due nanosistemi è stata testata *in vitro* in un campione composto

da Gd-Lipo-CD20, F-NE-CD4, e una miscela 1:1 dei due agenti. Le immagini pesate sul T1, sul T2 e sugli atomi di fluoro hanno permesso di poter visualizzare i due diversi agenti, anche se presenti nello stesso campione.

CONCLUSIONI

Questo progetto pilota ha dimostrato il potenziale della RMN per visualizzare *in vivo* due popolazioni di linfociti (T e B) coinvolte nell'insorgenza e progressione della SM. La procedura consiste nell'iniezione di due tipologie di nanoparticelle progettate per generare un diverso contrasto e decorate con anticorpi specifici per le due popolazioni cellulari. Anche se l'indisponibilità di una linea cellulare immortalizzata CD4-positiva ha parzialmente limitato il test del sistema F-NE-CD4, i dati raccolti sono altamente propedeutici per la traslazione *in vivo* del metodo su un modello murino di SM. Tuttavia, il divario verso l'identificazione di meccanismi patogeni o lo sviluppo di nuove terapie basate su questo approccio rimane piuttosto grande.

In vivo dual MRI detection of T and B lymphocytes in a MS mouse model: implications in the pathogenesis and therapeutic treatment

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system (CNS), associated with several alterations including neuroinflammation, demyelination and axonal. T lymphocytes are considered the "key cells" of the immune responses in MS, where they contribute to the disease pathogenesis. However, also other immune cells (such as B lymphocytes) seem to be involved to the disease onset. The *in vivo* detection of the recruitment of immune cells into CNS would provide key information into the spatio-temporal activation/migration of these cells and could elucidate their role in the development and progression of the pathology. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a very suitable technique for tracking cell phenotypes *in vivo*, even simultaneously.

The primary aim of this project was to label T- and B-lymphocytes *in vivo* using two nanosized MRI agents and tracking the labelled cells in a MS murine model (EAE).

To get the simultaneous detection of the two cell phenotypes, two nanoagents able to generate different and not interfering MRI contrast modes: T1 weighted contrast and fluorine-based MR contrast, were designed. To favor the labelling, the two nanosystems are conjugated with antibodies against CD4 (for T-cells) or CD20 (for B-cells)

markers. Once labelled, lymphocytes could provide real-time information on their trafficking, activation timing and mutual interactions into the CNS.

RESULTS

As the original 3-years project was downgraded to a one-year pilot project, the objectives of the research were reexamined and limited to the *in vitro* experiments in order to assess the potential of the proposed approach.

The first step of the activity was the synthesis of a phospholipid suitably modified to make possible the exposure of the antibodies on the outer surface of the nanoparticles. Then, two nanoparticles able to: i) generate a different MRI contrast, and ii) specifically target B- or T-lymphocytes were prepared.

The first nanoagent was a liposome loaded with an amphiphilic Gd(III) complex Gd-DOTAMA-(C18)₂ and decorated with an anti-CD20 antibody for labelling B-lymphocytes. This system, named Gd-LIPO-CD20, generates a T1-weighted MRI contrast in virtue of the paramagnetic metal centers embedded in the liposomes membrane. The second nanosystem was a fluorinated nanoemulsion made of perfluoro-crown-ether and decorated with anti CD4-antibody for targeting T-lymphocytes. This agent,

named F-NE-CD4, can be detected by fluorine-MRI. The performance of the two nanosystems were validated *in vitro* in terms of their ability to be recognized by the corresponding cell populations.

Gd-LIPO-CD20 (labeled with phycoerythrin for fluorescence detection) was tested on the CD20-positive A20 cells and either FACS or confocal microscopy experiments performed revealed a high specificity of the nanosystem towards CD20-expressing cells.

Due to the unavailability of an immortalized CD4+ cell line, the evaluation of the performance of F-NE-CD4 was carried out on blood cells from healthy mice that was also added with Gd-LIPO-CD20. The results obtained displayed a marked avidity of F-NE-CD4 towards T-lymphocytes, while only a negligible amount of Gd-LIPO-CD20 was taken up by this cell population. No uptake of F-NE-CD4 was detected in CD20-positive B-lymphocytes, proving the high specificity grade of the nanosystems, while Gd-LIPO-CD20 did not show an appreciable binding to CD20+ due to the lack of expression of this receptor in healthy blood immune cells. For this reason, the affinity of Gd-Lipo-CD20 towards CD20+ blood cells was assessed on a mouse model of amyotrophic lat-

eral sclerosis (ALS) disease, where a good labeling of B-lymphocyte with Gd-Lipo-CD20 was measured by FACS. Finally, the MRI detectability of the two nanosystems was monitored in a phantom composed by Gd-Lipo-CD20, F-NE-CD4, and a 1:1 mixture of the two agents. T1w, T2w and 19F-MR images were acquired at 7 T. As expected, and according to the sequence employed, it was possible to discriminate the two different agents.

CONCLUSIONS

The work performed within this pilot project has demonstrated the potential of tracking by *in vivo* MRI two cell populations (T- and B-lymphocytes) involved in MS onset and progression through the injection of nanoparticles suitably designed to generate different MRI contrast and decorated with antibodies for targeting the two cell populations. Though the unavailability of an immortalized CD4+ cell line has partially limited the MRI testing of the F-NE-CD4 system, the body of collected data is highly propaedeutic for the *in vivo* translation of this method on a mouse MS model. However, the gap towards the elucidation of pathogenic mechanisms or the development of new therapies based on this approach is still quite large.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Garello F, Stefania R, Bitonto V, Conti L, Boido MM, Terreno E, In vivo dual MRI detection of T and B lymphocytes in a MS mouse model: implications in the pathogenesis and therapeutic treatment, Rome, Congresso FISM 2019, May 29th-31st, 2019*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Aggredire il dolore neuropatico e il danno assonale nella sclerosi multipla tramite una modulazione genetica delle proteine ELAV



Nicoletta Galeotti

Università degli Studi di Firenze, Firenze

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Maria Domenica Sanna, Vittoria Borgonetti, Laura Lucarini

PREMESSE E OBIETTIVI

Attualmente la terapia farmacologica della sclerosi multipla (SM) si basa sull'uso di farmaci immunomodulatori e agenti anti-infiammatori. Tale terapia non impedisce però la progressione della patologia e l'aggravarsi della sintomatologia e una parte sostanziale dei pazienti con SM continua a sperimentare recidive o progressione clinica. Oltre alla disabilità motoria, si può manifestare una vasta gamma di alterazioni neurologiche. Tra queste il dolore ha una prevalenza del 63% ed è definito dai pazienti come uno dei sintomi più difficili da controllare. I farmaci antidolorifici arrivano a rappresentare quasi il 30% della terapia farmacologica usata per il controllo dei vari sintomi della SM, ma la soddisfazione dei pazienti nella gestione terapeutica del dolore è generalmente bassa. Tra le varie forme di dolore associate alla SM, il dolore neuropatico è il meno responsivo alle terapie antalgiche. Il dolore neuropatico rappresenta un sintomo neurologico conseguente alle lesioni neuronali dei pazienti con SM. Il controllo dei processi coinvolti nella neurodegenerazione potrebbe consentire lo sviluppo di una strategia neuroprotettiva in grado di contrastare il dolore aberrante non più in maniera sintomatica, ma mirata al controllo delle cause che producono il dolore neuropatico e, auspicabilmente, di rallentare la progressione della disabilità neurologica correlata alla SM.

Evidenze cliniche suggeriscono che il trattamento della SM dovrebbe essere basato su una combinazione di strategie antinfiammatorie, rigenerative e neuroprotettive. Pertanto, l'identificazione di un componente cellulare che potrebbe controllare i fenomeni infiammatori e immunitari e contrastare la neurodegenerazione, rappresenterebbe un obiettivo terapeutico ideale per il controllo della SM e dei sintomi associati. In questa ottica, lo scopo del progetto era quello di sfruttare la modulazione genetica

dell'espressione delle ELAV come potenziale prospettiva terapeutica per la SM e il dolore neuropatico associato alla SM. Le proteine ELAV sono una famiglia di proteine che legano l'RNA e includono il membro ubiquitario HuR, che promuove l'infiammazione e le risposte immunitarie, e i membri neuronali (nELAV) HuB, HuC, HuD, che sono coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento neuronale. Poiché queste proteine agiscono di concerto, modulare HuR potrebbe controllare la neuroinfiammazione, ma anche aiutare a contrastare la neurodegenerazione attraverso la modulazione dell'espressione delle nELAV.

RISULTATI

Per verificare questa ipotesi, abbiamo usato un modello animale di SM recidivante-remittente. Topi immunizzati hanno sviluppato disabilità motoria e ipersensibilità al dolore con un profilo dei sintomi ad andamento recidivante-remittente. La determinazione temporale dell'espressione di HuR ha mostrato un aumento dell'espressione di questa proteina nel midollo spinale in coincidenza con la comparsa del primo picco di disabilità.

In assenza di modulatori farmacologici delle ELAV, abbiamo studiato il ruolo di questa sovraespressione di HuR mediante un approccio genetico attraverso l'uso di un oligonucleotide antisense (ASO), disegnato e caratterizzato dal nostro gruppo di ricerca per ridurre la sovraespressione di HuR. Il trattamento con ASO ha ridotto la disabilità motoria e il dolore e ha attenuato la perdita di peso corporeo durante le recidive, mentre durante le fasi di remissione non è stato osservato alcun effetto. Per quanto riguarda gli eventi cellulari prodotti dal trattamento, l'anti-HuR ASO ha ridotto la neuroinfiammazione nel midollo spinale dei topi immunizzati, ha contrastato la demielinizzazione e ripristinato il quadro alterato dell'espressione di neurofilamento H, indicando una potenziale attività neuroprotettiva indotta dal silenziamento di HUR.

CONCLUSIONI

Il progetto di ricerca ha evidenziato un'espressione alterata della proteina HuR in un modello animale di SM correlato a disabilità e ipersensibilità al dolore. Questi risultati potrebbero, in primo luogo, aiutare a identificare la patobiologia del dolore neuropatico, sindrome dolorosa più comune e difficile da trattare nei pazienti con SM. Poiché è stato ipotizzato che il dolore neuropatico origini come conseguenza della demielinizzazione e della perdita assonale nei pazienti con SM, questo progetto può contribuire a chiarire il meccanismo patogenetico della SM e aiutare a identificare un bersaglio comune coinvolto nel dolore neuropatico e nella neuroinfiammazione. L'identificazione di una sovraespressione del gene HuR nei pazienti con SM potrebbe consentire, entro pochi anni, di unire diversi sintomi della SM con

un nuovo e unico meccanismo patogenetico.

Negli ultimi anni c'è stato un crescente consenso sull'importanza e sul vantaggio clinico della "medicina di precisione". In particolare, l'uso di ASO nella terapia delle malattie neurodegenerative appare molto promettente. La strategia ASO è già in studi clinici per patologie neuromuscolari (cioè SLA, SMA) e alcuni di essi sono stati approvati dalla FDA avendo fornito chiari benefici clinici in studi clinici rigorosamente controllati. Un silenziamento di HuR mediato da ASO rappresenterebbe un approccio innovativo per il trattamento della SM con potenziale traslazione in clinica. Aggredire HuR potrebbe rappresentare una strategia innovativa e promettente per controllare i disturbi neurologici nei pazienti con SM e diventare un adiuvante interessante delle terapie disponibili.

Targeting neuropathic pain and axonal damage in multiple sclerosis through genetic modulation of ELAV RNA binding proteins

INTRODUCTION AND AIMS

Currently-approved therapy for MS, based on immunoregulators and anti-inflammatory drugs, is not successful, since a substantial proportion of MS patients continue to experience relapses or clinical progression. In addition to motor disability, a broad range of neurological functions can be affected and, among them, pain has a prevalence of 63% and is rated by patients as one of their most challenging symptoms. Pain medications can account for nearly 30% of all drug use for all MS symptoms, but patient satisfaction with their pain management is generally low. MS-associated neuropathic pain is the most difficult to treat pain symptoms for MS patients and it is reported as a direct and/or indirect effect of neuronal lesions. Controlling the processes involved in neurodegeneration might allow the development of a neuroprotective strategy able to counteract the aberrant pain and, hopefully, the progression of MS-related neurological disability.

Clinical evidence suggests that treatment of MS should be based on a combination of anti-inflammatory, regenerative, and neuroprotective strategies. Thus, the identification of a cellular component that might control inflammatory and immune phenomena and counteract neurodegeneration, would represent an ideal therapeutic target for MS and MS-associated symptoms. With this in mind, the aim of the project was to exploit the genetic modulation of ELAV expression as a potential therapeutic perspective for MS and MS-associated neuropathic pain. ELAV proteins are a family of RNA binding proteins that include the ubiqui-

tous member HuR, that promotes inflammation and immune responses, and the neuronal members (nELAV) HuB, HuC, HuD, that are involved in neuronal development and maintenance. Since these proteins act in concert, targeting HuR might control neuroinflammation and help counteract neurodegeneration through the modulation of nELAV expression.

RESULTS

To verify this hypothesis, we used an animal model of relapsing-remitting MS. Immunized mice developed motor disability and pain hypersensitivity with a relapsing-remitting profile and time-course studies showed an increase of HuR protein expression within the spinal cord in coincidence with the appearance of the first peak of disease. In the absence of ELAV pharmacological modulators, we investigated the role of HuR overexpression by a genetic approach through the use of an antisense oligonucleotide (ASO) design by our research group to reduce the overexpression of HuR. ASO treatment reduced motor disability and pain, and attenuated the loss of body weight during relapses whereas no effect was observed during remission phases. Concerning the cellular events produced by the treatment, anti-HuR ASO reduced neuroinflammation in the spinal cord of immunized mice, counteracted demyelination and restored the altered pattern of neurofilament expression, indicating a potential neuroprotectant activity induced by HuR silencing.

CONCLUSIONS

The research project has illustrated an altered expression of HuR protein in an animal model of MS that is related to disability and pain hypersensitivity. This information might, first, help identify the pathobiology of the most common and difficult to treat pain syndrome of MS patients. Since neuropathic pain has been hypothesized to originate as a consequence of demyelination and axonal loss in MS patients, this project will contribute to elucidate the pathogenetic mechanism of MS and help identify a common pathogenic target involved in neuropathic pain and neuroinflammation. Identification of a HuR gene overexpression in MS patients could allow, within few years, to join different MS symptoms

under a new, unique pathogenic mechanism.

In recent years there is an increasing consensus on the importance and clinical advantage of “precision medicine”. Specifically, the use of ASO in the therapy of neurodegenerative diseases appears very promising. The ASO strategy is already in clinical studies for neuromuscular pathologies (i.e. ALS, SMA) and some of them have been approved by FDA having provided clear clinical benefits in rigorously controlled clinical trials. An ASO-mediated HuR silencing would represent an innovative approach to MS treatment with potential translation to clinics. Targeting HuR might represent an innovative and promising strategy to control neurological disturbances in MS patients and would become an interesting adjuvant to the available therapies.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Borgonetti V, Sanna MD, Lucarini L, Galeotti N. Targeting the RNA-binding protein HuR alleviates neuroinflammation by promoting M1/M2 polarization in experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain, Behavior and Immunity submitted*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 years and the amount of € 30,000

Modulazione multi-target del sistema endocannabinoide come innovativo approccio terapeutico per la sclerosi multipla



Clementina Manera

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Tiziano Tuccinardi, Paola Nieri, Simone Bertini, Maria Digiacomo, Sara Carpi, Beatrice Polini, Serena Meini, Francesca Gado

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Andrea Chicca, Ines Reynoso-Moreno, Vanessa Petrucci, Istituto di Biochimica e Medicina Molecolare (IBMM), Università di Berna, Svizzera

Lorenzo Di Cesare Mannelli, Carla Ghelardini, Laura Micheli, Elena Lucarini, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino - Neurofarba, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Manuela Marcoli, Chiara Cervetto, Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Genova, Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni la sperimentazione preclinica e clinica ha evidenziato come la modulazione di alcuni dei singoli componenti (target) del sistema endocannabinoide (SEC) rappresenti un promettente metodo per il controllo dei sintomi e/o della progressione della sclerosi multipla (SM). Sulla base di questa premessa è possibile ipotizzare che la modulazione simultanea di più target di questo sistema possa offrire un'attività farmacologica più efficace e più sicura rispetto alla modulazione di un singolo target. Questa è l'ipotesi del progetto volto a sintetizzare e valutare nuovi modulatori multi-target del SEC in grado di esercitare la loro attività "pro-cannabinoide" mediante più di un meccanismo di azione e che potrebbero fornire una maggiore efficacia, minori effetti collaterali ed esercitare effetti additivi o sinergici nel controllo dei sintomi e della progressione della SM.

RISULTATI

Nel primo periodo del progetto è stata sintetizzata una nuova serie di modulatori del SEC che sono stati caratterizzati *in vitro* per la loro attività verso più target del SEC e *in silico* per la loro farmacocinetica e tossicità. Sulla base di questi studi è stato selezionato il composto FM6b caratterizzato da una potente attività agonista su entrambi i recettori CB1 e CB2, da attività inibitoria sull'enzima FAAH e da buone proprietà farmacocinetiche.

Successivamente, sono stati condotti saggi *in vitro* per valutare l'attività di FM6b verso la neuroinfiammazione e il danno eccitotossico provocato dal rilascio di glutammato, che costituiscono due meccanismi patogenetici della SM. I risultati dimostrano che FM6b è in grado di ridurre, mediante un meccanismo dipendente dal recettore CB2, la produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e IL-6) e aumentare al contempo le citochine antinfiammatorie (IL-10) in cellule microgliali di ratto attivate da lipopolisaccaride (LPS). Inoltre, FM6b ha mostrato di ridurre, mediante un meccanismo dipendente dal recettore CB1, il rilascio di glutammato evocato dalla depolarizzazione in terminali nervosi isolati dall'ippocampo di ratto.

In vivo, in un modello murino di dolore neuropatico (sintomo comune nei pazienti con SM) indotto da oxaliplatino, FM6b ha prodotto un potente effetto antinocicettivo, grazie all'attivazione di entrambi i recettori cannabinoidi. Infine, in un modello sperimentale di SM (noto come encefalomielite sperimentale autoimmune, ESA), FM6b ha determinato un miglioramento significativo della gravità della malattia, sia nella fase iniziale che in quella più tardiva. Sulla base dell'attività agonista esercitata da FM6b su entrambi i recettori CB1 e CB2, è possibile ipotizzare che il miglioramento iniziale evidenziato nel modello ESA sia principalmente legato all'attivazione del recettore CB1, possibilmente riducendo l'eccessivo rilascio di glutammato (eccitotossicità). Nella se-

conda fase, FM6b ha mostrato effetti più pronunciati e di più lunga durata, contrastando la neuroinfiammazione attraverso l'attivazione del recettore CB2. Questa ipotesi è indirettamente supportata dai risultati ottenuti *in vitro* sul rilascio di glutammato e sulle cellule microgliali. Inoltre non è possibile escludere anche un contributo parziale dovuto all'attività inibitoria di FM6b sull'enzima FAAH, che potrebbe contribuire all'effetto farmacologico *in vivo*. Nella prima fase di risposta, FM6b ha comunque mostrato alcuni effetti indesiderati legati all'attivazione del recettore CB1, quali abbassamento della temperatura corporea, riduzione della locomozione spontanea e induzione di catalessia. Tali effetti sono risultati comunque transitori, ovvero sono scomparsi dopo pochi giorni dall'inizio del trattamento. Questi dati hanno in ogni caso permesso di dimostrare che FM6b può diffondere attraverso la barriera emato-encefalica e raggiungere una concentrazione bioattiva nel cervello.

I risultati ottenuti confermano come la modulazione del SEC possa contrastare la patofisiologia dell'ESA con il coinvolgi-

mento del recettore CB1, limitando il rilascio del glutammato neuronale per un effetto neuroprotettivo, e del recettore CB2 sulle cellule microgliali per contrastare la neuroinfiammazione.

CONCLUSIONI

I nostri dati supportano l'importanza della modulazione del SEC per il controllo dei sintomi e della progressione della SM. Il composto FM6b, quale modulatore multi-target del SEC, ha dimostrato *in vivo* un potente effetto antinocicettivo ed è risultato capace di ridurre la neuroinfiammazione e la neurodegenerazione su base eccitotossica. Ciò potrebbe rivelarsi utile anche in altre patologie del sistema nervoso centrale in cui processi neurodegenerativi mediati dall'infiammazione svolgono un ruolo fondamentale. I risultati ottenuti sono incoraggianti per futuri sviluppi di modulatori multi-target del SEC, capaci di controllare i sintomi e allo stesso tempo la progressione della SM.

Multi-target modulation of the endocannabinoid system as an innovative therapeutic approach for multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In recent years, preclinical and clinical studies have shown that the modulation of distinct targets of the endocannabinoid system (ECS) may represent a new promising therapeutic strategy for controlling the symptoms and/or progression of multiple sclerosis (MS). On these bases, it is reasonable to assume that the simultaneous modulation of different targets within this system should offer a safer and more effective pharmacological strategy as compared to the single-target modulation. This is the guiding hypothesis of this project aimed at synthesizing and evaluating new multi-target modulators that exert "pro-cannabinoid" activities through different mechanisms, and which could provide greater efficacy, less side-effects and exert additive or synergistic effects in controlling the symptoms and progression of MS.

RESULTS

In the first period of the project, a new series of ECS modulators was synthesized and characterized *in vitro* for their activity on the main targets of the ECS and *in silico* for their pharmacokinetic and toxicity properties. Based on these studies, the compound FM6b was identified as the most promising one, with a high affinity and agonist activity on both CB1 and CB2 receptors, an inhibitory activity on the degrading enzyme FAAH, and good drug-like properties. Subsequently, *in vitro* assays were performed to evaluate the activity of

FM6b on neuroinflammation and on excitotoxic damage caused by the release of glutamate, that are two pivotal pathogenic mechanisms of MS. In particular, FM6b was able to reduce the LPS-induced activation of microglial cells in a CB2 receptor-dependent manner by decreasing secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6), while enhancing anti-inflammatory cytokine (IL-10). Furthermore, FM6b was also able to reduce the depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals isolated from rat hippocampus in a CB1 receptor-dependent manner.

In vivo, FM6b showed a potent CB1 and CB2 receptor-dependent antinociceptive effect in a mouse model of oxaliplatin-induced neuropathic pain, which is a common symptom in MS patients. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of MS, FM6b exhibited a significant improvement of disease severity both in the earlier and later phases of the disease. Based on its dual agonism on CB1 and CB2 receptors, we can speculate that the initial improvement of disease severity induced by FM6b is mostly linked to the CB1 receptor activation possibly by reducing excessive glutamate release (excitotoxicity). In the second phase, FM6b was able to exert more pronounced and longer lasting effects by counteracting neuroinflammation through CB2 receptor activation. This hypothesis is indirectly supported by our data obtained *in vitro* on the release of glutamate and on microglial cells. Furthermore, a partial contribution

due to the inhibitory activity of FM6b on the FAAH enzyme, which could contribute to the pharmacological effect *in vivo*, cannot be excluded. However, in the first response phase, FM6b showed some undesirable effects related to the activation of the CB1 receptor, such as reduction in locomotion, in body temperature and catalepsy-like behaviour. Nevertheless, these effects were transient, and disappeared after a few days from the start of treatment. In any case, these data demonstrate that FM6b can diffuse across the blood-brain barrier and reach a bioactive concentration in the brain. The results obtained from this project confirm that ECS modulation can counter EAE pathophysiology limiting the release of neuronal glutamate by CB1 receptor activation, and can reduce neuroinflammation by CB2 receptor activation.

CONCLUSIONS

Our data support the importance of ECS modulation for controlling the symptoms and progression of MS. The compound FM6b, as a multi-target modulator of the ECS, demonstrated *in vivo* a powerful antinociceptive effect and was able to reduce neuroinflammation and excitotoxic-induced neurodegeneration.

This could also be useful in other pathologies of the central nervous system in which neurodegenerative processes mediated by inflammation play a fundamental role. The obtained results are encouraging for future developments of multi-target ECS modulators, able to reduce the symptoms and at the same time the progression of MS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Gado F, Arena C, Fauci C, Reynoso-Moreno I, Bertini S, Digiaco M, Meini S, Poli G, Macchia M, Tuccinardi T, Gertsch J, Chicca A, Manera C. Modification on the 1,2-dihydro-2-oxo-pyridine-3-carboxamide core to obtain multi-target modulators of endocannabinoid system. *Bioorganic Chemistry* 2020; 94:103353
- Gado F, Meini S, Bertini S, Digiaco M, Macchia M, Manera C. Allosteric modulators targeting cannabinoid CB1 and CB2 receptors: implications for drug discovery. *Future Medicinal Chemistry* 2019; 11: 2019-2037
- Gado F, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Bertini S, Cappelli S, Digiaco M, Stevenson LA, Macchia M, Tuccinardi T, Ghelardini C, Pertwee RG, Manera C. Identification of the First Synthetic Allosteric Modulator of the CB2 Receptors and Evidence of Its Efficacy for Neuropathic Pain Relief. *Journal of Medicinal Chemistry* 2019; 62: 276-287
- Gado F, Digiaco M, Macchia M, Bertini S, Manera C. Traditional Uses of Cannabinoids and New Perspectives in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Medicines (Basel)* 2018; 5: pi E91
- Arena C, Gado F, Di Cesare Mannelli L, Cervetto C, Carpi S, Reynoso-Moreno I, Polini B, Vallini E, Chicca S, Lucarini E, Bertini S, D'Andrea F, Digiaco M, Poli G, Tuccinardi T, Macchia M, Gertsch J, Marcoli M, Nieri P, Ghelardini C, Chicca A, Manera C. 1,2-dihydro-2-oxo-pyridine-3-carboxamide multi-target modulator of endocannabinoid system improves disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. Submitted to *Journal of Medicinal Chemistry*
- Gado F, Bertini S, Digiaco M, Meini S, Reynoso-Moreno I, Micheli L, Nieri P, Vallini E, Carpi S, Polini B, Cervetto C, Macchia M, Gertsch J, Marcoli M, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Chicca A, Manera C. 1,2-dihydro-2-oxo-pyridine-3-carboxamide derivative as multi-target modulator of endocannabinoid system for an innovative therapeutic approach in multiple sclerosis. Conference abstract, VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry Athens, Greece, September 1-5, 2019.
- Gado F, Bertini S, Digiaco M, Meini S, Reynoso-Moreno I, Micheli L, Nieri P, Carpi S, Polini B, Cervetto C, Tuccinardi T, Gertsch J, Marcoli M, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Chicca A, Macchia M, Manera C. New multi-target modulator of endocannabinoid system for an innovative therapeutic approach in multiple sclerosis. Conference abstract. XXVI National Meeting in Medicinal Chemistry: NMMC2019. Milan July 16-19 2019
- Gado F, Bertini S, Digiaco M, Meini S, Reynoso-Moreno I, Polini B, Micheli L, Nieri P, Carpi S, Cervetto C, Marcoli M, Tuccinardi T, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Chicca A, Manera C. Multi-target modulation of the endocannabinoid system as an innovative therapeutic approach for multiple sclerosis. Conference abstract. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, May 29-31 2019
- Gado F, Meini S, Bertini S, Stevenson LA., Pertwee RG., Manera C. Synthesis and biological evaluation of a new series of 1-2-dihydropyridine carboxamide derivatives as CB2 receptor allosteric modulators. Conference abstract. 26th Young Research Fellow Meeting. Paris February 20-22 2019
- Gado F, Silicani L, Guazzelli L, Macchia M, Manera C, D'Andrea F. Rational design and synthesis of glyco-conjugates of 1,2-dihydro-2-oxo-pyridine-3-carboxamide derivatives as new modulators of the endocannabinoid system. Conference abstract. European School of Medicinal Chemistry. Urbino July 1-5 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 100.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 100,000

Homing e target cellulari di esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali adipose nell'encefalomielite autoimmune sperimentale



Bruno Bonetti

Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona, Clinica Neurologica, Verona

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Ermanna Turano, Roberta Bonafede, Ilaria Scambi, Raffaella Mariotti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Alice Busato, Pasquina Marzola, Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona, Verona

Gabriela Constantin, Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Sezione di Patologia, Università degli Studi di Verona, Verona

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule mesenchimali adipose (ASC) sono cellule staminali multipotenti adulte isolate dal tessuto adiposo, in grado di auto-rinnovarsi e differenziarsi. Grazie all'abbondante disponibilità, alla capacità di migrare verso i tessuti danneggiati e di contribuire ai processi riparativi, sono di grande interesse per una potenziale applicazione terapeutica nella sclerosi multipla (SM). La somministrazione di ASC nel modello animale di encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA), ha dimostrato che le ASC sono in grado di migliorare il decorso della malattia grazie alla loro capacità di modulare la risposta immunitaria e sostenere la sopravvivenza e la proliferazione di progenitori locali. Diversi studi indicano che le ASC esercitano i loro effetti benefici principalmente attraverso il rilascio di fattori solubili che influenzano il microambiente circostante piuttosto che attraverso la loro permanenza nei tessuti danneggiati. Tra questi fattori, oggetto del nostro studio sono stati gli esosomi: nano vescicole da 30 a 100 nm di diametro di origine endosomiale, che hanno mostrato un ruolo neuro-protettivo e immunomodulatorio in diversi modelli *in vitro* ed *in vivo*. A questo proposito, abbiamo recentemente dimostrato che gli esosomi derivati da ASC migliorano gli aspetti clinici e patologici dell'ESA modulando l'attivazione delle cellule T e l'extravasazione verso siti infiammatori. Gli studi condotti finora si sono concentrati sugli effetti immunoregolatori degli esosomi derivati da ASC, ma in vista delle future applicazioni terapeutiche, resta da stabilire se gli eso-

somi sono in grado di raggiungere i siti di lesione del sistema nervoso centrale (SNC) infiammato e individuare i loro bersagli cellulari.

In questo progetto abbiamo proposto lo sviluppo di un metodo *in vivo* non invasivo per la visualizzazione degli esosomi nei topi con ESA utilizzando nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetico (USPIO) mediante risonanza magnetica (RM), nonché lo studio dei loro target cellulari. I risultati di questo progetto rappresentano un primo passo importante verso un uso terapeutico degli esosomi da ASC per il trattamento della SM.

RISULTATI

Abbiamo sviluppato un metodo non invasivo per la visualizzazione dell'homing delle nanovesicole *in vivo*, coniugandole con nanoparticelle ferrose USPIO. Prima di tutto abbiamo valutato l'homing degli esosomi coniugati con USPIO mediante risonanza magnetica (RM) dopo iniezione intramuscolare e intravenosa (i.v.) sia in topi wild-type che ESA. La presenza di esosomi-USPIO è stata confermata dopo iniezione intramuscolare mediante RM e confermata da analisi istochimica. Dopo iniezione i.v. di esosomi-USPIO nei topi ESA, siamo stati in grado di identificare la presenza di esosomi marcati nei loro linfonodi, mentre i topi di controllo (topi iniettati con PBS) non hanno mostrato positività. Nessun segnale è stato osservato nel cervello e nel midollo spinale dopo l'iniezione, probabilmente a causa della bassa sensibilità della RM per

poter rilevare le quantità di ferro contenute negli esosomi che raggiungono il SNC. La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) rappresenta la tecnica standard per identificare le nanoparticelle. L'analisi dei linfonodi tramite TEM di animali ESA precedentemente iniettati con esosomi-USPIO ha mostrato la presenza di nanoparticelle della dimensione prevista. Questa è, per quanto ne sappiamo, la prima prova diretta mai descritta sulla migrazione degli esosomi in un sito target dell'ESA. Al fine di migliorare la penetrazione delle vescicole coniugate mediante MRI abbiamo deciso di eseguire un'iniezione intranasale (i.n.) degli esosomi-USPIO. I risultati hanno mostrato che la somministrazione i.n. di esosomi-USPIO ha consentito il rilevamento del segnale nel cervello degli animali (wild-type ed ESA). Dopo la somministrazione i.n. nei topi ESA i segnali MRI sono stati osservati nelle aree di danno cerebrale mentre nei topi di controllo la distribuzione del segnale è risultata essere casuale.

CONCLUSIONI

L'uso delle ASC può rappresentare un promettente approccio terapeutico nella SM. Nanovesicole ottenute da ASC sono state utilizzate in diversi modelli sperimentali, incluso l'ESA, come innovativa terapia non cellulare. I risultati ottenuti dal nostro gruppo hanno mostrato che gli esosomi derivati dalle ASC sono in grado di migliorare il decorso della malattia nei topi affetti da ESA. La somministrazione degli esosomi presenta numerosi vantaggi, ulteriormente accentuati da una potenziale, poco invasiva, somministrazione intranasale: questo tipo di somministrazione può essere ripetuta ogni volta che è necessario, è facilmente trasferibile all'uomo e ne consentirebbe un utilizzo sicuro, evitando l'uso delle cellule parentali.

Questo progetto sta aprendo la strada allo sviluppo di future terapie meno invasive che utilizzano gli esosomi da ASC per il trattamento della SM.

Homing and cell targets of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis

INTRODUCTION AND AIMS

Adipose-derived stromal cells (ASC) are adult multipotent stem cells isolated from adipose tissue, capable of self-renewal and differentiation. Due to the easy availability, their ability to migrate to damaged tissue and to contribute to repair processes, they are of great interest for therapeutic applications in multiple sclerosis (MS). The administration of ASC in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model, showed that ASC are able to ameliorate the animal disease course due to their ability to modulate the immune response and to sustain the survival and proliferation of local progenitors. Several lines of evidence indicate that ASC exert their beneficial effects mainly through the release of soluble factors which influence the surrounding microenvironment rather than to their engraftment in the damage tissues. Among these factors, we focused our studies on exosomes: nanovesicles from 30 to 100 nm in diameter of endosomal origin which have shown a neuroprotective and immunomodulatory role in several models *in vitro* and *in vivo*. In this regard, we have recently demonstrated that ASC-derived exosomes ameliorate clinical and pathological aspects of EAE by modulating T cell activation and extra-vascularity to inflammatory sites.

The studies performed so far have been concentrated on the immunoregulatory effects of ASC-derived exosomes but

in view of future therapeutic applications, it remains to be established if ASC-derived exosomes are able to reach the inflamed central nervous system (CNS) lesions and their cellular targets.

In this project we proposed the development of a non-invasive *in vivo* method for the visualization of the homing of exosomes in EAE mice using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (USPIO). We aimed to identify ASC-exosomes *in vivo* after their systemic administration in EAE mice by magnetic resonance imaging (MRI) as well as the study of their cellular target(s). The results of this project represent a first important step towards a therapeutic use of ASC-exosomes for the treatment of MS.

RESULTS

We developed a non-invasive method for the visualization of the homing of nanovesicles *in vivo*, using USPIO nanoparticles. We evaluated the homing of USPIO-loaded exosomes by MRI after intramuscular and intravenous injection (i.v.) in both wild-type and EAE mice. The presence of USPIO-exosomes was revealed after intramuscular injection by MRI and confirmed by histochemical analysis. After i.v. injection of USPIO-exosomes in EAE mice, we were able to identify by histochemistry the presence of labeled exosomes in their lymph nodes, whereas, control mice

(PBS-injected mice) showed no positivity. Indirect evidence of USPIO-loaded exosomes in lymph nodes was also observed by MRI. No signal was observed in brain and spinal cord after USPIO-exosomes injection. We speculate that the amount of iron contained in exosomes reaching the CNS was absent or below the sensitivity of MRI. The transmission electronic microscopy (TEM) represents the gold standard technique to identify nanoparticles. We first concentrated our attention on lymph nodes, where we have observed a strong signal by histochemistry. Indeed, analysis by TEM of lymph nodes from EAE animals previously injected with USPIO-exosome, showed the presence of nanoparticles of the expected size. This is, to the best of our knowledge, the first, direct evidence ever described of the migration of exosome in an EAE target site. In order to improve the penetration of labelled vesicles by MRI, we decided to perform an intranasal (i.n.) injection of the USPIO-exosomes. The results showed that i.n. administration of USPIO-exosomes enabled the detection of the signal in the brain of the animals (both

wild type and EAE) with both MRI and histochemical analysis. Noteworthy, after i.n. administration in EAE mice MRI signals are preferentially located in areas of brain injury and not randomly, as observed in control mice.

CONCLUSIONS

The use of ASC may represent a promising therapeutic approach in MS. Recently, nanovesicles obtained from ASC have been used in different experimental models, including EAE, as an innovative non-cell-based therapy. Results obtained by our group showed that exosomes derived from ASC are able to ameliorate disease course in EAE mice. The administration of exosomes has several advantages, further accentuated by a potential i.n. administration: can be repeated whenever necessary, is easily transferable to humans and would enable a safe administration.

This project is paving the way for the development of future and less invasive therapies of ASC-exosomes for the treatment of MS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Turano E, Bonafede R, Scambi I, Busato A, Marzola P, Constantin G, Mariotti R e Bonetti B. - *Homing e target cellulari di esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali adipose nell' encefalomielite autoimmune sperimentale* - XVIII Congresso AINI, Camogli, 2019

Progetto di ricerca finanziato con il bando FISM 2016 per il periodo di 2 anni (prorogato di 7 mesi) e l'ammontare di 113.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 2 years (extended by 7 months) and the amount of € 113,000

L'inibizione di SIRT6 come un approccio terapeutico nel trattamento della sclerosi multipla



Santina Bruzzone

CEBR, Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Andrea Benzi, Davide Frumento, Sonia Spinelli, Laura Sturla

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Antonio Uccelli, Giovanni Ferrara, Valentina Petrosino, CEBR e DINOGMI,
Università degli Studi di Genova, Ospedale Policlinico San Martino-IRCCS, Genova

Claudia Verderio, Federica Scaroni, Istituto di Neuroscienze, CNR, Milano

PREMESSE E OBIETTIVI

L'enzima sirtuina 6 (SIRT6) è coinvolto nella risposta infiammatoria di alcuni tipi cellulari, compreso il rilascio di citochine da parte di linfociti T. SIRT6, per svolgere la sua azione, utilizza la molecola NAD: in studi precedenti, effettuati su un modello di sclerosi multipla sviluppato in animali, abbiamo dimostrato che abbassare i livelli di NAD migliora il decorso della patologia, probabilmente perché interferisce con il funzionamento di SIRT6. Nel nostro laboratorio sono state recentemente identificate molecole in grado di inibire l'attività enzimatica di questa proteina. Gli inibitori di SIRT6 possiedono attività anti-infiammatoria e anti-proliferativa su cellule T. In questo progetto pilota proponiamo di verificare il loro potenziale impiego nella sclerosi multipla, nella riduzione della neuroinfiammazione, utilizzandoli in un modello animale di questa patologia, denominato Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAS). Questi inibitori sono già stati utilizzati da noi con successo in modelli animali di altre patologie, dimostrando di non avere effetti collaterali.

RISULTATI

In questo progetto abbiamo dimostrato che la somministrazione di uno degli inibitori da noi identificato ritarda significativamente l'esordio di malattia EAS. Purtroppo, quando l'inibitore è stato somministrato dopo l'esordio della malattia, non ha ridotto i sintomi clinici in modo significativo. Abbiamo ottenuto indicazioni che il meccanismo tramite cui inibire questo enzima ritarda l'esordio della patologia dipende dall'effetto dell'inibitore sulle cellule dendritiche, cellule importanti nell'attivazione della risposta immunitaria. Negli animali trattati con l'inibitore, nei giorni immediatamente

precedenti all'esordio della malattia, i linfonodi risultavano essere ridotti rispetto a quelli di animali che non avevano ricevuto il trattamento. L'inibizione della SIRT6 ha ridotto la migrazione delle cellule dendritiche dalla periferia al linfonodo locale, modificando l'espressione da parte di cellule dendritiche di recettori che ne modulano la migrazione. In aggiunta, negli animali che avevano ricevuto il trattamento, le cellule dendritiche che avevano raggiunto il linfonodo locale, esprimevano marcatori di attivazione ridotti rispetto agli animali che non avevano ricevuto il trattamento. Inoltre, abbiamo ottenuto dati preliminari che indicano che l'inibizione di SIRT6 riduce l'attivazione delle cellule della risposta immunitaria nel sistema nervoso centrale (le cellule di microglia).

CONCLUSIONI

Il nostro gruppo ha recentemente identificato i primi inibitori specifici per SIRT6 e li abbiamo utilizzati nella EAS. Il fatto che SIRT6 moduli la risposta immunitaria era già noto, ma la mancanza di composti specifici aveva finora impedito lo studio dell'effetto della inibizione farmacologica di SIRT6 nello sviluppo della EAS, come di altre patologie. I nostri dati indicano che la SIRT6 ha un ruolo nella patogenesi della EAS, in particolare nell'attivazione della risposta immunitaria. Aver identificato un composto che è in grado, seppur in parte, di inibire l'attivazione della risposta immunitaria regolando la migrazione delle cellule dendritiche, potrebbe essere di rilevanza per la SM. Gli inibitori che abbiamo ora a disposizione devono essere migliorati nelle loro caratteristiche, così come vari aspetti devono ancora essere valutati, prima di poter pensare a una loro somministrazione nell'uomo.

SIRT6 inhibition as a therapeutic approach for treating multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The enzyme sirtuin 6 (SIRT6) is involved in the inflammatory response of some cell types, including the release of cytokines by T lymphocytes. SIRT6 uses the NAD molecule to carry out its action: in previous studies, carried out on a model of multiple sclerosis developed in animals, we have shown that lowering NAD levels improves the course of the disease, probably because it interferes with the functioning of SIRT6. In our laboratory, molecules capable of inhibiting the enzymatic activity of this protein have recently been identified. SIRT6 inhibitors have anti-inflammatory and anti-proliferative activity on T cells.

In this pilot project we propose to verify their potential use in multiple sclerosis, in the reduction of neuroinflammation, using them in an animal model of this pathology, called Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). These inhibitors have been already used by us successfully in animal models of other pathologies, showing that they have no side effects.

RESULTS

In this project we have shown that the administration of one of the inhibitors identified by us, significantly delays the onset of the EAE disease. Unfortunately, when the inhibitor was administered after the onset of the disease, it did not significantly reduce clinical symptoms.

We have obtained indications that the mechanism by which the inhibition of this enzyme delays the onset of the disease depends on the effect of the inhibitor on dendritic cells, which are important cells in activating the immune response. In animals treated with the inhibitor, in the days

immediately preceding the onset of the disease, the lymph nodes were reduced compared to those of animals that had not received the treatment. SIRT6 inhibition reduced the migration of dendritic cells from the periphery to the local lymph node, modifying the expression by dendritic cells of receptors that modulate their migration. In addition, in the animals that had received the treatment, the dendritic cells that had reached the local lymph node expressed reduced activation markers compared to the animals that had not received the treatment.

In addition, we obtained preliminary data indicating that the inhibition of SIRT6 reduces the activation of the immune response cells in the central nervous system (the microglia cells).

CONCLUSIONS

Our group recently identified the first specific inhibitors for SIRT6 and we used them in EAE. The fact that SIRT6 modulates the immune response was already known, but the lack of specific compounds had so far prevented the study of the effect of pharmacological SIRT6 inhibition in the development of EAE, as of other pathologies. Our data indicate that SIRT6 has a role in the pathogenesis of EAE, in particular in activating the immune response. Having identified a compound that is able, albeit in part, to inhibit the activation of the immune response by regulating the migration of dendritic cells, could be of relevance for MS. The inhibitors that are currently available to us must be improved in their characteristics, as well as various aspects have yet to be assessed, before we can plan their administration in humans.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Sociali G, Liessi N, Grozio A, Caffa I, Parenti MD, Ravera S, Tasso B, Benzi A, Nencioni A, Del Rio A, Robina I, Millo E, Bruzzone S. Differential modulation of SIRT6 deacetylase and deacylase activities by lysine-based small molecules. *Mol Divers.* 2019 Jun 25. doi: 10.1007/s11030-019-09971-2
- FASEB Summer Conference "The NAD Metabolism and Signalling Conference", Dublin, Ireland, June 23rd- July 1st 2019
- 2nd Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists - Bryan, Milano, Italy 14th-16th-November 2019

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Ruolo del CD28 e della PI3K di classe 1A nella regolazione dei processi metabolici associati alle risposte pro-infiammatorie dei linfociti T nella sclerosi multipla



Loretta Tuosto

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie Charles Darwin, Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Martina Kunkl, Nicla Porciello, Silvana Caristi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Luca Battistini, Manolo Sambucci, *Laboratorio di Neuroimmunologia, I.R.C.C.S. Fondazione Santa Lucia, Roma*

Claudio Gasperini, Serena Ruggieri, *Unità di Neurologia, Ospedale San Camillo, Roma*

PREMESSE E OBIETTIVI

Numerosi studi hanno evidenziato un ruolo chiave del metabolismo cellulare nella regolazione dell'attivazione, del differenziamento e delle funzioni effettrici dei linfociti T. Inoltre, specifiche vie metaboliche controllano il differenziamento e le funzioni infiammatorie dei linfociti T in diverse malattie autoimmuni. In particolare, un aumento della glicolisi è stato associato al differenziamento dei linfociti Th17 e a una sua compromissione corrispondeva un'alterata attività soppressoria dei linfociti T regolatori (Treg) nella sclerosi multipla (SM). L'espansione dei linfociti Th17 e la riduzione di Treg rappresentano le principali anomalie osservate nella SM. Pertanto, la caratterizzazione delle molecole recettoriali e dei mediatori di segnalazione associati, che coordinano i processi metabolici coinvolti sia nell'amplificazione sia nel mantenimento dei linfociti T infiammatori nella SM, potrebbero aiutare a sviluppare nuove opportunità terapeutiche.

Il CD28 è un recettore costimolatorio cruciale che coopera con il TCR per indurre l'attivazione completa dei linfociti T. Il CD28 umano è anche in grado di fornire segnali indipendenti dal TCR e di indurre la trascrizione e secrezione di citochine e chemochine pro-infiammatorie sia in soggetti sani sia in pazienti con SM recidivante remittente (SMRR). Il CD28 regola anche il metabolismo dei linfociti T favorendo l'assorbimento dei nutrienti, la glicolisi e le vie

anaboliche. Infatti, il CD28 attiva la PI3K di classe 1A e la via Akt/mTOR associata.

La via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR regola il metabolismo dei linfociti T favorendo la glicolisi aerobica, promuovendo il differenziamento dei Th17, inibendo la proliferazione e le funzioni soppressorie dei Treg e migliorando l'autoimmunità in modelli murini di SM. Il presente progetto ha avuto lo scopo di caratterizzare il ruolo del CD28 e della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR nella modulazione dei programmi metabolici che regolano le risposte infiammatorie dei Th17 nella SM.

RISULTATI

L'analisi delle vie metaboliche coinvolte nelle funzioni infiammatorie mediate dal CD28 ha evidenziato che la stimolazione del CD28 induceva un aumento significativo della glicolisi nei linfociti T CD4⁺ isolati dal sangue periferico di pazienti SMRR (n = 30) senza alterare la fosforilazione ossidativa mitocondriale. L'aumentata glicolisi indotta da CD28 era anche associata all'aumento del trasportatore di glucosio Glut1, dei marcatori attivazione CD69, CD71 e CD25, mentre l'espressione di PD-1 non era influenzata. L'analisi dell'espressione di Glut1 nelle diverse sottopopolazioni cellulari ha evidenziato che i Th17 (CXCR3-CCR6⁺) esprimono livelli più elevati di Glut1 rispetto ai Th1 (CXCR3 + CCR6⁻) o ai Th0 (CXCR3-CCR6⁻) e la stimolazione del CD28 induceva un aumento di Glut1

in tutte e tre le popolazioni analizzate, sebbene in misura maggiore nei Th17. Coerentemente con i nostri dati precedenti, la stimolazione autonoma del CD28 induceva anche un aumento delle citochine pro-infiammatorie, in particolare di quelle correlate ai Th17, quali IL-6, IL-21, IL-22 e IL-17A. Inoltre, la forte inibizione delle citochine indotta dall'inibitore della glicolisi, 2-desossi-D-glucosio, supporta il ruolo cardine della glicolisi nella funzione pro-infiammatoria del CD28.

L'analisi dei principali enzimi che regolano il metabolismo del glucosio ha inoltre rivelato che l'induzione della glicolisi da parte del CD28 nei linfociti T di persone con SMRR era associata a un forte aumento di c-myc. Abbiamo, infatti, scoperto che dopo la stimolazione del CD28, i fattori di trascrizione STAT3 e RelA/NF- κ B erano reclutati sui

promotori di c-myc e IL-17A inducendone l'espressione. Infine, abbiamo osservato che il trattamento dei linfociti T di pazienti SMRR con un inibitore specifico della PI3K di classe 1A (AS605240) inibiva fortemente il metabolismo glicolitico, l'espressione di c-myc e Glut1, nonché l'up-regolazione delle citochine pro-infiammatorie e dei marker di attivazione indotti dal CD28.

CONCLUSIONI

Complessivamente questi dati evidenziano un importante contributo della PI3K di classe 1A associata al CD28 nella riprogrammazione dei processi metabolici che mantengono/amplificano il fenotipo infiammatorio dei linfociti T periferici e suggeriscono la PI3K di classe 1A un valido bersaglio terapeutico per la SM.

Role of CD28 and associated class 1A PI3K in the regulation of the cellular metabolic programs associated to pro-inflammatory T cell responses in MS

INTRODUCTION AND AIMS

Several studies have evidenced a key role of cellular metabolism in regulating the activation, differentiation and functions of T cells. Specific metabolic pathways have been also described to control the differentiation and inflammatory functions of T cells in autoimmune diseases. In particular, elevated glycolysis has been associated with Th17 differentiation and functions and impaired glycolysis has been also shown to correspond with altered suppressive activity of regulatory T lymphocytes (Treg) in multiple sclerosis (MS). The expansion of Th17 cells and reduction of suppression function and number of Treg represent the main abnormalities in MS. Thus, the characterization of receptor molecules and associated signalling mediators, which coordinate the metabolic processes involved in both amplification and/or maintenance of inflammatory T cells in MS, may help in developing novel therapeutic opportunities.

CD28 is a crucial costimulatory receptor that cooperates with TCR for inducing full T cell activation. Human CD28 is also able to deliver TCR-independent signals and to induce the transcription and secretion of Th17-related pro-inflammatory cytokines and chemokines in both healthy subjects and in relapsing remitting MS (RRMS) patients. CD28 also contributes to T cell metabolism by enhancing the uptake of nutrients, aerobic glycolysis and anabolic pathways induced by TCR stimulation. Indeed, following stimulation CD28 activates class 1A PI3K that

in turn induces the Akt/mTOR pathway.

The PI3K/Akt/mTOR signalling pathway regulates T cell metabolism by switching metabolism to aerobic glycolysis, promoting Th17 cell differentiation and inhibiting the proliferation and suppressive functions of Treg cells, thus ameliorating autoimmunity in murine models of MS.

Starting from these evidences, the present project has been aimed to characterize the role of CD28 and associated PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in the modulation of the metabolic programs regulating pro-inflammatory T cell responses and Th17 cell subset in MS.

RESULTS

The analysis of the metabolic pathways involved in CD28-mediated inflammatory functions evidenced that CD28 stimulation induced a significant increase of glycolysis in CD4⁺ T cells from RRMS patients (n = 30), who had not undergone any treatment, without any significant changes in mitochondrial oxidative phosphorylation. CD28-induced increase of glycolysis was also associated with the up-regulation of the glucose transporter Glut1, specific surface activation markers, such as CD69, CD71 and CD25, whereas the expression of PD-1 was not affected. The analysis of Glut1 expression in different Th cell subsets, revealed that Th17 cells (CXCR3⁻CCR6⁺) expressed higher levels of Glut1 compared to Th1 (CXCR3⁺CCR6⁻) or Th0 cells (CXCR3⁻CCR6⁻) and CD28 stimulation up-regulated Glut1 expression in

all T cell subsets, although to a higher extent in Th17 cells. Consistently with our previous data, CD28 autonomous stimulation of CD4⁺ T cells from RRMS strongly up-regulated the expression of pro-inflammatory cytokines, most of which were related to the Th17 cell phenotype, such as IL-6, IL-21, IL-22 and IL-17A. Moreover, the strong inhibition of CD28-induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines exerted by the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose revealed a pivotal role of glycolysis in CD28 pro-inflammatory functions.

The analysis of the major enzymes regulating the glycolytic pathway evidenced that CD28-mediated up-regulation of the glycolytic pathway in CD4⁺ T cells from RRMS patients was associated to a strong increase of c-myc in both STAT3- and RelA/NF- κ B-dependent manner. Indeed, we found that following CD28 stimulation STAT3 and

RelA/NF- κ B were recruited on both c-myc and IL-17A gene promoters and induced their expressions.

Finally, treatment of CD4⁺ T cells from RRMS patients with a class 1A PI3K inhibitor (AS605240) strongly inhibited the glycolytic metabolism, c-myc and Glut1 expressions, as well as the up-regulation of pro-inflammatory cytokines and activation markers induced by CD28 stimulation.

CONCLUSIONS

Altogether these data evidence an important contribution of CD28-associated class 1A PI3K in reprogramming the metabolic processes that maintain/amplify the inflammatory phenotype of peripheral T cells and suggest class 1A PI3K as a valid therapeutic candidate for MS.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Pubblicazioni / Publications

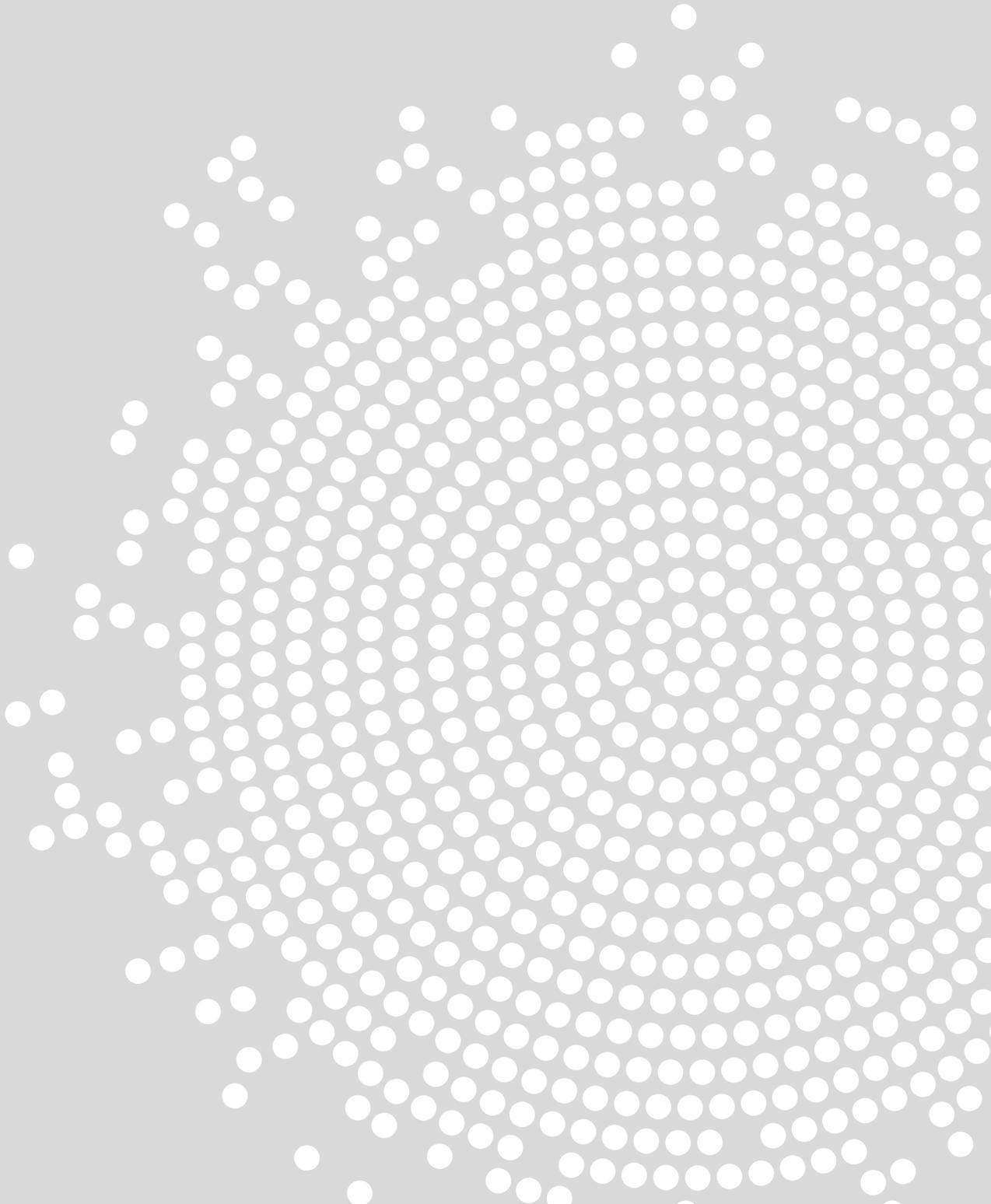
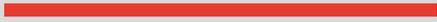
- Kunkl M, Sambucci M, Ruggieri S, Amormino C, Tortorella C, Gasperini C, Battistini L, Tuosto L. CD28 autonomous signaling up-regulates c-myc expression and promotes glycolysis enabling inflammatory T cell responses in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2019 Jun 11;8(6) pii: E575. doi: 10.3390/cells8060575
- Kunkl M, Mastrogiovanni M, Porciello M, Caristi S, Monteleone E, Arcieri S, Tuosto L. CD28 individual signalling up-regulates human IL-17A expression by promoting the recruitment of RelA/NF- κ B and STAT3 transcription factors on the proximal promoter. *Front Immunol*. 2019 Apr 24;10:864. doi: 10.3389/fimmu.2019.00864. eCollection 2019
- Tuosto L, Xu C. Editorial: Membrane Lipids in T Cell Functions. *Front Immunol*. 2018 Jul 9;9:1608. doi: 10.3389/fimmu.2018.01608
- Porciello N, Kunkl M, Tuosto L. CD28 between tolerance and autoimmunity: the side effects of animal models. *F1000Res*. 2018 May 30;7. pii: F1000 Faculty Rev-682. doi: 10.12688/f1000research.14046.1
- Porciello N, Grazioli P, Campese AF, Kunkl M, Caristi S, Mastrogiovanni M, Muscolini M, Spadaro F, Favre C, Nunès JA, Borroto A, Alarcon B, Screpanti I, Tuosto L. A non-conserved amino acid variant regulates differential signalling between human and mouse CD28. *Nat Commun*. 2018 Mar 14;9(1):1080. doi: 10.1038/s41467-018-03385-8
- Kunkl M, Porciello N, Mastrogiovanni M, Capuano C, Lucantoni F, Moretti C, Persson JL, Galandrini R, Buzzetti R, Tuosto L. ISA-2011B, a Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α inhibitor, impairs CD28-dependent costimulatory and pro-inflammatory signals in human T lymphocytes. *Front Immunol*. 2017 Apr 26;8:502. doi: 10.3389/fimmu.2017.00502

Comunicazioni a congress / Congress presentations

- Kunkl M, Mastrogiovanni M, Porciello N, Caristi S, Monteleone E, Arcieri S, Tuosto L. RelA/NF- κ B and STAT3 transcription factors cooperate in trans-activating the human IL-17A proximal promoter in response to CD28 individual stimulation. *Eur J Immunol* 2019 Sep: 49 (suppl 1): 181. 2nd Joint Meeting of the German-Society-for-Immunology (DGfI) and the Italian-Society-of-Immunology-Clinical-Immunology-and-Allergology (SIICA), Sep 10-13 2019, Munich, Germany
- Kunkl M, Sambucci M, Ruggieri S, Amormino C, Caristi S, Gasperini C, Battistini L, Tuosto L. CD28 and associated class 1A P13K regulates the glycolytic metabolic program associated to pro-inflammatory T cell responses in Multiple Sclerosis. *Eur J Immunol* 2019 Sep: 49 (suppl 1): 188-189. 2nd Joint Meeting of the German-Society-for-Immunology (DGfI) and the Italian-Society-of-Immunology-Clinical-Immunology-and-Allergology (SIICA), Sep 10-13 2019, Munich, Germany
- Porciello N, Kunkl M, Grazioli P, Campese AF, Caristi S, Mastrogiovanni M, Muscolini M, Spadaro F, Favre C, Nunès JA, Borroto A, Alarcon B, Screpanti I, Tuosto L. The importance of being proline: biochemical and functional difference between human and mouse CD28 cytoplasmic tail. *EMBO Workshop Lymphocyte antigen receptor signaling*, August 25-29, 2018, Siena, Italy
- Kunkl M, Porciello N, Mastrogiovanni M, Capuano C, Lucantoni F, Moretti C, Jenny L, Persson, Galandrini R, Buzzetti R, Tuosto L. ISA-2011b, a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α inhibitor, impairs CD28-dependent costimulatory and pro-inflammatory signals in human T lymphocytes. *XI National Congress of SIICA*, May 28-31, 2017, Bari, Italy
- Kunkl M, Porciello N, Mastrogiovanni M, Capuano C, Lucantoni F, Moretti C, Jenny L, Persson, Galandrini R, Buzzetti R, Tuosto L. Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α impairs CD28-dependent costimulatory and pro-inflammatory signals in human T lymphocytes. *12th ENII Summer School on Advanced Immunology*, May 6-13, 2017, Porto Cervo, Italy

PROGETTI SPECIALI

SPECIAL PROJECTS



Introduzione / Introduction

Oltre ai progetti finora elencati, che si sono conclusi nel 2019, riportiamo di seguito tutti i progetti speciali finanziati. AISM, attraverso la sua Fondazione, FISM, sostiene infatti con le proprie risorse anche la ricerca dedicata a progetti speciali che coprono specifiche aree d'interesse. Si tratta di 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 dell'Associazione nel finanziare e promuovere la ricerca e le infrastrutture necessarie per rispondere alle azioni messe in campo dall'Agenda delle Persone con SM (Agenda 2020).

Per rispondere concretamente alla strategia complessiva dell'Agenda, è importante avere anche gli strumenti e la Fondazione si è dotata di una mappa strategica di finanziamento e promozione della ricerca della Fondazione che mette in luce l'importanza di applicare modelli diversificati di finanziamento, per ottenere ricadute concrete per le persone con SM. La mappa prevede diversi gradi di coinvolgimento della Fondazione nella selezione delle iniziative e dei progetti di ricerca da promuovere e finanziare (gestione del portfolio) e nella gestione, scientifica e amministrativa, degli stessi (gestione del progetto).

AISM con la sua Fondazione finanzia e promuove programmi speciali focalizzati sulle forme progressive di SM, sullo sviluppo di terapie rimielinizzanti e neuroriabilitative e gli studi clinici con cellule staminali, per migliorare la qualità di vita e ottenere risposte concrete a livello sanitario. Sono evidenziati anche i progetti che dimostrano l'impegno di AISM nel sostenere, insieme ad altri enti di ricerca, le infrastrutture di ricerca e le risorse per la gestione delle stesse anche per garantire che i risultati della ricerca siano condivisi come per il progetto Registro Italiano SM e il progetto INNI-Network Italiano di Neuroimaging.

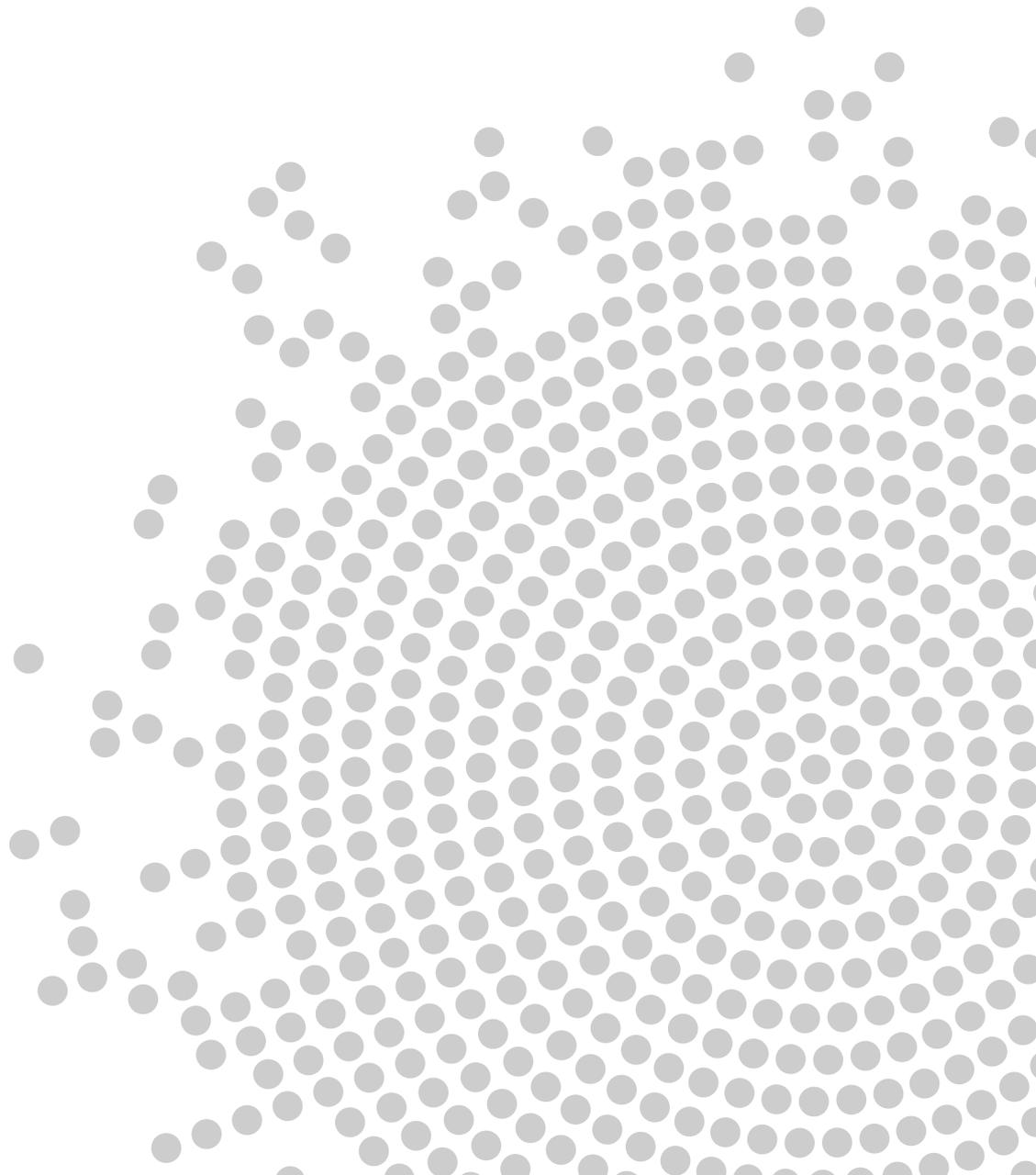
In addition to the projects listed so far, which ended in 2019, we report below all the special projects. Through its Foundation, in fact, AISM also supports, with its own resources, special projects which cover specific areas of interest. These are wide-ranging, multi-year research projects involving 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 necessary to respond to the actions put in place by the People with MS Agenda (Agenda 2020).

In order to respond concretely to the overall strategy of the Agenda, FISM has adopted a strategic funding and promoting map of its research, which highlights the importance of applying to diversified financing models, to increase the impact of health research on people with MS. This map involves different degrees of involvement of the Foundation in the selection of research initiatives and projects to be promoted and financed (portfolio management) and in the scientific and administrative management of the same (project management).

The Italian MS Foundation finances and promotes special programs focused on progressive MS, on the development of remyelination and neurorehabilitation therapies, on clinical studies with stem cells, to improve the quality of life and obtain concrete answers at a health level. The projects that demonstrate AISM's commitment to supporting research infrastructures and resources to ensure that research results are shared are also highlighted, as for the Italian SM Register project and the INNI-Italian Neuroimaging Network project.

Advocacy

Advocacy



Ricognizione dell'offerta riabilitativa per la sclerosi multipla nei diversi contesti regionali



Paolo Bandiera

Affari Generali, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto è stato realizzato nel corso del 2019, a partire dal mese di febbraio sino a quello di dicembre.

Le diverse fasi ed attività

1. Analisi degli assetti organizzativi e dei modelli di configurazione della rete dei servizi riabilitativi per la sclerosi multipla nei diversi contesti regionali.
2. Approfondimento della tipologia e quantità di servizi riabilitativi offerti nei territori regionali per le persone con SM.
3. Indagine sulle persone con SM in contatto con l'Associazione al fine di identificare le criticità esistenti nei diversi contesti territoriali in materia di risposte riabilitative accessibili alle persone.

RISULTATI

I modelli di rete riabilitativa nei PDTA per la SM

Il Progetto ha evidenziato come negli ultimi anni grazie all'introduzione di Percorsi Diagnostico Terapeutici Assistenziali (PDTA) dedicati alla SM, e al ruolo di stimolo e rappresentanza svolto dall'Associazione, si stiano affermando protocolli di presa in carico riabilitativa differenziati per livelli di disabilità. I modelli proposti da AISM si stanno progressivamente diffondendo e conducono a:

- progressiva presa di coscienza del valore di cura della riabilitazione
- piani di riqualificazione dei processi (dalla visita fisiatrica dopo la diagnosi a un approccio fondato sull'adozione del PRI e sulla definizione di obiettivi condivisi chiari e definiti nel tempo in luogo di pacchetti di prestazioni, all'integrazione del percorso riabilitativo con quello farmacologico, al raccordo con le cure palliative, etc)
- una più adeguata scelta dei setting privilegiando ove possibile quello ambulatoriale e domiciliare
- una crescita delle competenze degli operatori, avviando corsi di formazione specifici anche con il coinvolgimento diretto di AISM
- la progettazione e implementazione di sistemi informativi e flussi di dati in prospettiva centrati su indicatori riferiti ai percorsi di terapia riabilitativa avviati e attuati.

Tuttavia si riscontrano ancora forti difformità tra le Regioni nella strutturazione della rete riabilitativa per la SM.

I dati derivanti dalle fonti regionali e ministeriali

A febbraio 2019 è stato inviato da AISM all'attenzione delle Regioni uno specifico questionario allo scopo di acquisire informazioni di dettaglio sulle tipologie, setting, volumi di prestazioni riabilitative per la sclerosi multipla.

A partire dalle richieste avanzate è stato possibile accedere a informazioni aggregate per le Regioni Piemonte, ER, Liguria oltre che, parzialmente, per la Regione Veneto. Nelle regioni Liguria e Veneto le maggiori difformità e carenze di copertura si registrano rispetto a quei pazienti non presi in carico dai servizi convenzionati offerti da AISM. Quanto ai dati forniti dalle Regioni ER e Piemonte, essi hanno posto in luce un quadro di differenze nell'offerta e nell'accesso all'interno degli stessi territori regionali evidenziando come rispetto al totale della popolazione con SM stimabile come eleggibile al trattamento, solo una percentuale parziale acceda effettivamente a prestazioni riabilitative, per lo più di natura fisioterapica.

È stato inoltre avviato un confronto con il Ministero della Salute sul tema del dimensionamento dei posti letto della Alta Specialità Neuroriabilitativa (codice 75) determinati in 1.216 posti letto a livello nazionale a fronte di un numero attuale di circa il doppio distribuiti in modo fortemente disomogeneo nelle regioni. Attraverso un confronto aperto e costruttivo tra AISM e Ministero della Salute, riguardo alle bozze di documenti ministeriali in tema di "Criteri di appropriatezza dell'accesso ai ricoveri di riabilitazione ospedaliera" e di "Individuazione di percorsi appropriati nella rete di riabilitazione", il lavoro di analisi e confronto sui dati ha portato a proposte di integrazioni e suggerimenti atti a garantire pienamente, e in prospettiva rafforzare, il diritto alla riabilitazione per le persone con SM e altre gravi condizioni.

Indagine sulle persone con SM

Per completare l'indagine ci si è concentrati nel raccogliere le indicazioni provenienti direttamente dalle persone con SM che hanno confermato come in buona parte dei

territori rimangono grandi le difficoltà che le persone con SM incontrano nell'accedere alla riabilitazione. Il progetto si è concentrato nell'analisi da parte dell'Osservatorio AISM dei ticket del Numero Verde e degli Sportelli territoriali, che hanno anche messo in evidenza un' inadeguata conoscenza da parte della maggioranza delle persone con SM sia dei contenuti del percorso riabilitativo che rispetto alle potenzialità delle diverse tipologie di trattamenti riabilitativi, con una tendenza a concentrarsi sulla sola fisioterapia. In secondo luogo le persone che si sono rivolte al Numero Verde AISM lamentano che a fronte della richiesta di aggiunta di cicli di fisioterapia avanzata all'ente pubblico, prevalentemente non si ottiene risposta positiva, e quando concessa con lunghi tempi di attesa; vengono poi segnalati numerosi casi di assunzione diretta dei costi della riabilitazione a carico della persona con SM e della sua famiglia. Per quanto riguarda gli ausili, le richieste e le segnalazioni attengono alla possibilità di ottenere specifici ausili sulla base di esigenze di personalizzazione e frequenti sono le lamentele per i tempi lunghi di fornitura.

Sono poi stati esaminati i dati provenienti da una specifica indagine condotta con il CENSIS nel 2017-2018 sulla condizione di vita delle persone con SM dove emerge, ad esempio, che:

- rispetto alla fruizione di terapie riabilitative, i servizi si concentrano nella fisioterapia (cui accedono 2 persone su 3)
- rispetto ai fruitori, oltre 1 persona su 2 dichiara che la fisioterapia offerta è comunque insoddisfacente per quantità e/o qualità (ciò determina che in numerosi casi la persona con SM sostenga direttamente il costo della riabilitazione)
- il 45% delle persone che fruiscono di servizi riabilitativi dichiara l'inesistenza di un Piano Riabilitativo Individuale (PRI).

CONCLUSIONI

Emerge come il bisogno riabilitativo sia quello in assoluto maggiormente insoddisfatto.

Review of rehabilitative provision for Multiple Sclerosis in different regional contexts in Italy

INTRODUCTION AND AIMS

The project was carried out in 2019, between February and December.

The project phases and activities:

1. Analysis of organizational structures and network configuration models for multiple sclerosis rehabilitation services in different regional contexts.
2. Focus on the type and quantity of rehabilitative services made available in different regions to people with multiple sclerosis.
3. Survey of people with MS in contact with the Association, to identify issues existing in different territorial contexts regarding availability of response to rehabilitation needs.

RESULTS

Rehabilitation network models in MS PDTAs

The Project highlighted that protocols of rehabilitation management differentiated for levels of disability have emerged in recent years, thanks to the introduction of Diagnostic Therapeutic and Support Pathways (PDTAs) dedicated to MS and to the stimulus and advocacy role played by the Association. The models proposed by AISM are gradually spreading, leading to:

- increasing awareness of the value of rehabilitation care

- plans to redesign processes (from the first examination with a psychiatrist after the diagnosis to an approach based on the adoption of the Individual Rehabilitation Plan - PRI - and the definition of clear and defined shared goals over time in place of packages of care, until the integration of rehabilitation and pharmacological pathway, and the connection with palliative care, etc.)
- increasingly appropriate choice of care settings, with a preference for outpatient and home settings where possible
- development of rehabilitation staff's skills, increased availability of specific training courses, often with the direct involvement of AISM
- design and implementation of information systems and prospective data flows on indicators related to rehabilitation pathways initiated and implemented.

However, there are still strong disparities across Regions in the extent to which and how the rehabilitation network for MS is structured.

Data collected from regional and ministerial sources

In February 2019 a specific questionnaire was sent by AISM to the Regions in order to acquire detailed information on the type, setting, and volume of rehabilitation services for multiple sclerosis being provided.

Thanks to the requests made, it has been possible to access aggregate data for Piemonte, Emilia-Romagna, Liguria and, partly, Veneto regions. In the regions of Liguria and Veneto, the main shortcomings in coverage are recorded for the patients that were not on the caseload of the services provided by AISM. With regard to the data provided by Emilia-Romagna and Piedmont regions, they have highlighted differences in supply and access within the same regional territories, showing that only a fraction of the whole population with MS eligible for the treatment actually access rehabilitative services, in most cases physiotherapy.

A conversation has also been established with the Ministry of Health, about the amount of beds of Neuro rehabilitative High Specialty (code 75) being determined in 1,216 beds nationwide, compared with a current number that is roughly twice as many, distributed in a highly uneven way across regions. Through an open and constructive discussion between AISM and the Ministry of Health, the work of analysis and comparison on the data has led to proposals for integrations and suggestions to fully guarantee, and in the future strengthen, the right to rehabilitation for people with MS and other serious conditions. This conversation aimed at contributing to the Ministry's draft documents "Criteria of appropriateness for the admission to inpatient rehabilitation" and "Identification of appropriate pathways in the rehabilitation network."

Survey of people with MS

The aim of the survey has been collecting the views of people with MS, who confirmed that in most areas there are still major difficulties for people with MS to access the Rehabilitation. The project focused on the AISM Observatory's analysis of the data generated by the Association's

toll-free helpline and by the orientation services provided by the Association's local branches. This data also showed that most people with MS have an inadequate knowledge of both the rehabilitative pathway and of the actual range of possible rehabilitative treatments, with a tendency to focus on physiotherapy alone. Secondly, many people who have called AISM's toll-free helpline complain that their requests of additional physiotherapy cycles are in most cases declined by the public system, and if granted they must face long waiting times. Moreover, many people with MS and their families reported paying out of pocket for rehabilitation. As for the aids, many requests received focus on difficulties in obtaining specific aids and having personalization needs fulfilled, while many complained about long supply times too.

Data from a specific survey conducted with CENSIS in 2017-2018 on the living conditions of people with MS were also examined, showing among other things that:

- in terms of the use of rehabilitative therapies, the services are mostly focused on physiotherapy (that was received by 2 out of 3 people that received any rehabilitation therapy)
- in terms of the users, more than 1 in 2 people who received it say that the physiotherapy provided was unsatisfactory in quantity and/or quality (that is why in many instances the person with MS directly paid the cost of rehabilitation)
- 45% of people who received rehabilitation services declared that they had no PRI (Individual Rehabilitation Plan).

CONCLUSIONS

The project showed that the need for rehabilitation therapy is the least met one.

Valutazione comparativa dei PDTA regionali per la sclerosi multipla e proposta di PDTA nazionale di riferimento



Paolo Bandiera

Affari Generali, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova

PREMESSE E OBIETTIVI

A partire dal 2014 è stata promossa – con il diretto coinvolgimento di AISM – l'introduzione di Percorsi Diagnostico Terapeutico Assistenziali (PDTA) per la SM in diverse Regioni. Ad oggi sono 13 le Regioni che hanno adottato e formalizzato PDTA regionali per la SM.

Il Progetto di "Valutazione comparativa dei PDTA regionali per la sclerosi multipla e proposta di PDTA nazionale di riferimento" - che ha avuto corso dal giugno 2018 al dicembre 2019 - ha consentito di analizzare secondo criteri uniformi tali documenti regionali che introducono PDTA dedicati alla patologia per identificare buone prassi così come criticità e, nello specifico, differenze metodologiche, approcci diversificati nella fissazione o meno di standard e soglie, attenzione rispetto ai diversi temi e nel contempo di elaborare una proposta di PDTA nazionale di riferimento per la SM.

RISULTATI

Attraverso l'analisi dell'impostazione e dei contenuti specifici dei PDTA regionali dedicati alla SM sono stati rilevati:

- gli elementi caratteristici presenti nei diversi PDTA per la SM
- gli elementi comuni di tutti i percorsi per la SM ad oggi formalizzati o in via di perfezionamento.

Sulla base di tale analisi è stato possibile elaborare, con il coinvolgimento di un gruppo di lavoro attivato dalle primarie Società Scientifiche di riferimento, Società Italiana di Scienze Neurologiche Ospedaliere (SNO) e Società Italiana di Neurologia (SIN), un modello di PDTA nazionale di riferimento a valere quale proposta di atto di indirizzo nazionale che è stato sottoposto al Ministero della Salute e alla Conferenza Stato - Regioni:

- la diagnosi accertata e tempestiva
- il trattamento farmacologico e il follow up adeguato e tempestivo, sia per i farmaci modificanti la malattia che per quelli sintomatici

- l'adozione di protocolli per la presa in carico riabilitativa
- la continuità Ospedale e Territorio
- l'integrazione socio sanitaria
- la redazione di progetti personalizzati di cura e assistenza
- l'adozione delle linee guida esistenti per l'accertamento medico legale
- l'applicazione di protocolli riconosciuti per la gestione della SM pediatrica
- la gestione delle persone con SM in condizioni gravi e gravissime
- la qualificazione e formazione degli operatori
- l'informazione e l'empowerment delle persone con SM e loro familiari.

La proposta di PDTA nazionale di riferimento scaturita dal Progetto vuole porsi come strumento in grado di fornire risposte uniformi alla complessità dei bisogni e dei percorsi assistenziali delle persone con SM coinvolgendo e coordinando in percorsi unitari le numerose figure professionali impegnate nei diversi stadi della malattia, ancor più se afferenti diversi livelli (ospedale, cure intermedie, cure primarie) e comparti (area sanitaria e area socio-assistenziale), sostenendo una integrazione e interazione tra ospedale e territorio che preveda in continuum il passaggio da un setting all'altro (territorio – ospedale - territorio) e la messa a sistema di funzioni, operatori, flussi informativi, linguaggi, culture.

Nello stesso tempo l'adozione di uno specifico PDTA nazionale di riferimento per la SM vuole rappresentare un importante strumento per la costruzione della rete di patologia.

La proposta di PDTA di riferimento nazionale

Partendo dalla analisi descritta al punto precedente, si è proceduto di concerto con le società scientifiche neurologiche coinvolte nello specifico gruppo di lavoro – SIN e SNO - alla messa a punto di una proposta di PDTA nazionale di riferimento per la SM che è stato sottoposto alla

Conferenza delle Regioni e al Ministero della Salute al fine di sostenere l'avvio dell'iter istituzionale per la relativa approvazione.

Il documento è orientato all'integrazione sociosanitaria e alla continuità delle cure; prevede il disegno di appositi percorsi e la presa in carico costante nel tempo da parte di un team caratterizzato da competenze sanitarie e sociali; esplicita criteri e formule di monitoraggio mediante adeguati strumenti di valutazione e di appropriatezza, basandosi sui seguenti principi e obiettivi:

- Centralità della persona
- Integrazione
- Uniformità
- Unitarietà
- Gestione di una patologia complessa ad andamento evolutivo
- Qualità
- Appropriatezza, efficacia ed efficienza
- Interdisciplinarietà
- Flessibilità
- Continuità dei percorsi di cura e integrazione socio-sanitaria
- Monitoraggio
- Diritto di cura.

Quanto ai contenuti, la proposta di PDTA nazionale detta indicazioni generali e di indirizzo legati alla diagnosi, al trattamento farmacologico, al follow up, alla componente riabilitativa, all'accertamento della disabilità, all'assistenza domiciliare, ai sostegni per i gravi e gravissimi, al collegamento con la rete cure palliative, all'inserimento lavorativo e al mantenimento del posto di lavoro, all'approccio alle forme pediatriche, mettendo in relazione le varie fi-

gure professionali: neurologo, case manager, infermiere, équipe integrata presso la struttura ospedaliera di riferimento, fisiatra ed équipe riabilitativa, strutture di cure intermedie esistenti, reti di cure primarie per come effettivamente strutturate sui territori, ripensando processi e protocolli d'intervento e creando le condizioni per l'empowerment e l'educazione della persona con SM perché svolga un ruolo centrale e attivo nel processo decisionale.

L'indice del documento

Parte I

Documento di indirizzo

1. Introduzione, epidemiologia e costi nella SM
2. Presa in carico
3. Percorso accertativo
4. Registro di malattia
5. Formazione per gli operatori
6. Informazione ed empowerment delle persone con SM e familiari
7. Proposta di indicatori per un PDTA per la SM
8. Osservatorio Nazionale Sclerosi Multipla

Parte II

Allegati tecnici

- ALL. 1 Trattamenti farmacologici modificanti il decorso della SM, disease modifying drugs (DMD)
- ALL. 2 Trattamenti sintomatici
- ALL. 3 Mappe degli episodi
- ALL. 4 Presa in carico nella SM pediatrica
- ALL. 5 Pubblicazioni AISM e strumenti informativi

Comparative evaluation of regional PDTAs for multiple sclerosis and proposal for a national PDTA

INTRODUCTION AND AIMS

Since 2014, Diagnostic Therapeutic and Support Pathways (PDTAs) for MS have been launched in several Italian regions- with the direct involvement of AISM. To date, 13 regions have adopted and formalised regional PDTAs for MS.

The project of "Comparative evaluation of regional PDTAs for Multiple sclerosis and proposal for a national PDTA" ran between June 2018 and December 2019 and consisted of a consistent analysis of regional PDTAs dedicated to MS. The analysis enabled the identification of good practices and criticalities and highlighted methodological differences, including different approaches to the use of standards and thresholds, and different priority given to different issues. This analysis constitutes a solid basis to draw up a proposal for a national PDTA for MS.

RESULTS

Analysis of the approach and content of each regional MS-specific PDTAs led to the identification of:

- Specific components found across different PDTAs for MS
- Common elements of all MS pathways launched to date, or that are being finalized

On the basis of this analysis it was possible to draw up, with the involvement of a working group activated by the relevant Scientific Societies (SIN, Italian Society of Neurology and SNO, Hospital Neurology Society), a national PDTA template, that was submitted to the Ministry of Health and the State Conference - Regions as a proposed national guidance. The template includes:

- Timely confirmed diagnosis
- Timely and adequate drug treatment and follow-up, both for disease-modifying and symptomatic drugs

- Adoption of rehabilitative care protocols
- Integration of hospital and community care
- Integration of health and social care
- Creation of personalized care and support plans
- Adoption of existing guidelines for the formal assessment of disability in MS
- Compliance with validated protocols in the management of pediatric MS
- Management of people with severe and very severe MS
- Training and qualification of care staff
- Information and empowerment of people with MS and their families.

The proposed national PDTA stemming from the Project is meant to become an established tool, capable of providing consistent response to the complex needs and care pathways of people with MS, and of coordinating in joined paths the numerous professional figures engaged in the different stages of the disease. Even more so if they work in different level organizations (hospital, intermediate care, primary care) and in different sectors (health area and social-welfare area), supporting integration and interaction between hospital and social care area. The ambition is that of ensuring a smooth transition across settings (community – hospital - community) and creating a system of functions, operators, information flows, languages, cultures.

At the same time, the adoption of a specific national PDTA for MS is intended to be an important tool for the construction of the pathology network.

The proposed National PDTA

Based on the analysis described above, we proceeded in collaboration with the neurological scientific societies involved in the specific working group – SIN and SNO – to the development of a proposal of national PDTA for MS that was submitted to the Conference of Regions and the Ministry of Health in order to support the start of the institutional process for its approval.

The document supports integration and continuity of health and social care; it involves the design of appropriate paths and continuous management of people with MS by a team holding both health and social care skills; it states clear monitoring criteria and formulas including suitable tools for assessing the appropriateness of care, based on the following principles and objectives:

- Centrality of the person
- Integration
- Uniformity

- Consistency
- Management of a complex progressive disease
- Quality
- Appropriateness, effectiveness and efficiency
- Interdisciplinarity
- Flexibility
- Continuity of the pathways of care and social and health integration
- Monitoring
- Right to receive care.

With regard to the contents, the proposal of the national PDTA provides general indications related to diagnosis, drug treatment, follow-up, rehabilitation, disability assessment, home care, support for the severe and very severe, connection with the palliative care network, job placement and maintenance of the workplace, approach to pediatric forms, connecting the various professional figures: integrated team at the hospital, psychiatrist and rehabilitative team, existing intermediate care facilities, primary care networks (as currently structured in each area), rethinking processes and protocols of intervention and creating the conditions for empowerment and education of the person with MS to play a central and active role in the decision-making process.

The contents of the document

Part I

Guidance document

1. Introduction, epidemiology and costs of MS
2. Taking charge (access to care management)
3. Assessment process
4. Disease registry
5. Training for operators
6. Information and empowerment of people with MS and family members
7. Proposed indicators for the monitoring and the evaluation of PDTA for MS
8. National Multiple Sclerosis Observatory

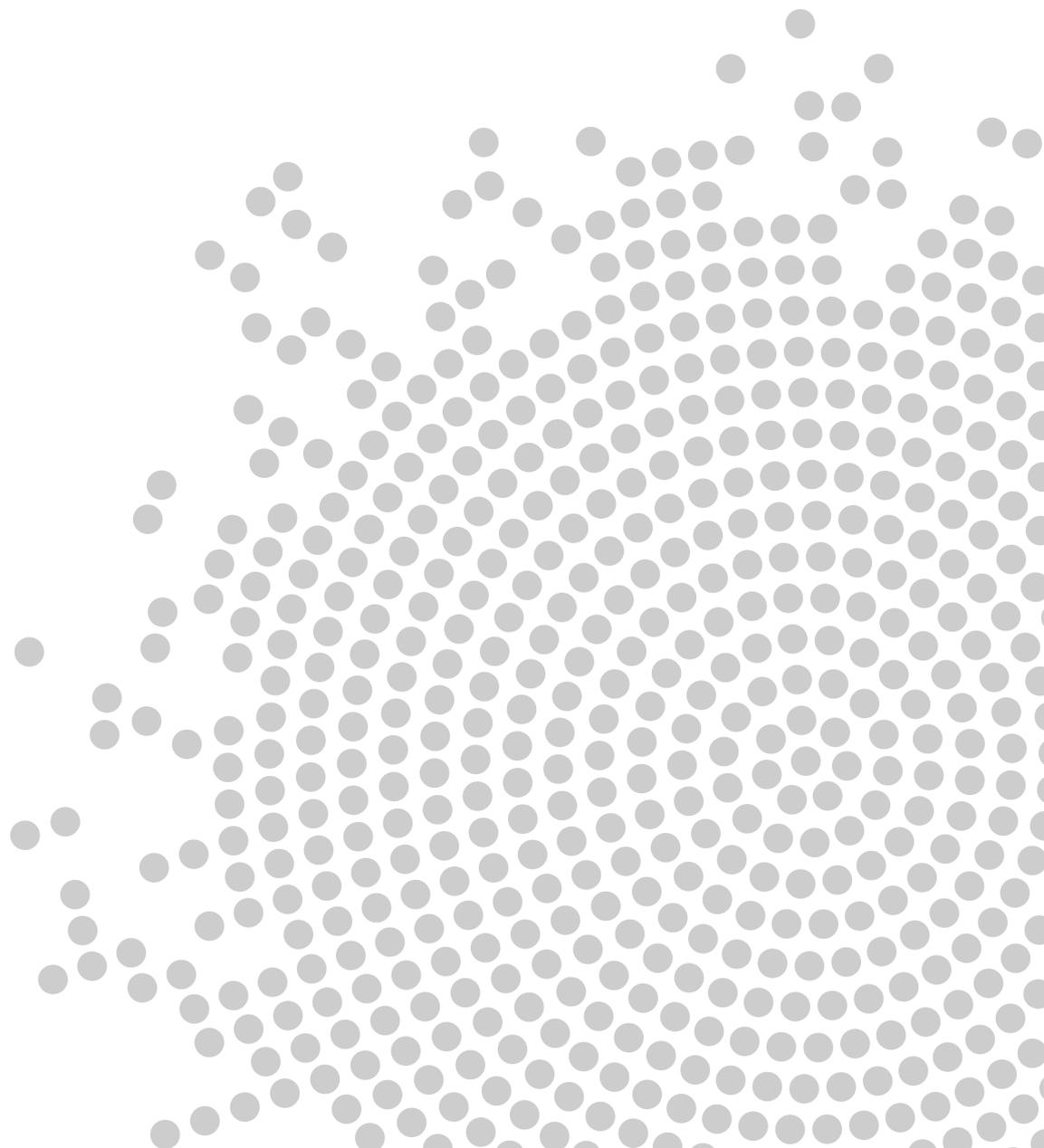
Part II

Technical attachments

- ALL. 1 Disease Modifying Drugs (DMD)
- ALL. 2 Symptomatic treatments
- ALL. 3 Episodes' Maps
- ALL. 4 Managing pediatric MS
- ALL. 5 AISM publications and information tools

Medicina personalizzata

Personalized
Medicine



Accountability e approccio multi-stakeholder per misurare l'impatto della ricerca



Carla Antonini

Dipartimento di Economia e Management, Università degli Studi di Trento, Trento

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Michele Andreaus, Ericka Costa, Caterina Pesci

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Carlos Larrinaga, Mercedes Luque Vélchez, Nicolás Garcia Torea, University of Burgos, Burgos, Spain

Eija Vinari, Anna Kork, University of Tampere, Tampere, Finland

Tommaso Ramus, Universidad Catolica de Portugal, Lisbona, Portugal

Le forme tradizionali di accountability e misurazione dell'impatto della ricerca sono focalizzate sulle priorità delle parti interessate con interessi economici e finanziari riguardanti il processo di ricerca. Sta diventando importante trovare nuove metriche appropriate per valutare l'impatto della ricerca sulle persone con SM seguendo un approccio multi-stakeholder. Le metriche convenzionali normalmente non sono in grado di soddisfare i diversi attori coinvolti.

La dimensione economica e finanziaria (efficienza) deve essere integrata con le misure che riguardano il raggiungimento del successo della missione (efficacia) e la responsabilità nei confronti di tutte le parti interessate che sono direttamente o indirettamente interessate dall'attività di un'organizzazione. Dalla prospettiva di un singolo stakeholder, il paradigma deve spostarsi verso la co-valutazione e una co-creazione che vedrà gli stakeholder del sistema ricerca collaborare alla definizione della misurazione dei risultati di ricerca, attraverso discussioni congiunte e un apprendimento reciproco. La definizione di metriche sarà strumentale per consentire la messa a punto di obiettivi comuni (agenda di ricerca comune) e di ritorno dell'investimento (ROI) per ciascuna delle parti interessate.

Nel complesso, l'obiettivo del progetto è sviluppare un nuovo modello di accountability che aiuterà le organizzazioni di pazienti, e in generale gli enti finanziatori della ricerca, a misurare la propria performance in relazione al raggiungimento della missione. Inoltre, il modello mira ad essere uno strumento da adottare, non solo, ma con particolare enfasi, dalle Associazioni SM per migliorare il processo decisionale nella programmazione di agende comuni, programmi di finanzia-

mento, procedure di valutazione, di politiche organizzative e altri aspetti strategici.

Il quadro per rendere operativa la co-accountability è il collective research impact framework (CRIF). Tentando di essere olistico e con un approccio sostenibile, il CRIF considera cinque dimensioni: missione, eccellenza, efficienza, sociale e, ultima ma non meno importante, la dimensione riportata dal paziente.

Il progetto ha prodotto tre risultati principali:

(1) L'identificazione sistematica delle misure attualmente utilizzate dell'impatto della ricerca presentata nel Database 1.0. Gli indicatori identificati attraverso la revisione della letteratura sono stati inseriti nel Database 1.0, che contiene complessivamente 1.544 indicatori.

(2) L'analisi delle opinioni degli esperti condotte attraverso interviste strategiche per la selezione di indicatori più pertinenti. Sono state condotte otto interviste pilota con le persone dell'External Advisory Board di MULTI-ACT. Le interviste hanno seguito un protocollo di intervista semi-strutturato sviluppato con lo scopo specifico di esplorare (i) la percezione delle parti interessate dell'impatto della ricerca sanitaria, e (ii) gli indicatori di responsabilità per valutare questo impatto. I risultati riportati nelle interviste di cui sopra sono stati fondamentali per la co-creazione della scorecard CRIF attraverso la selezione degli indicatori più rilevanti dell'impatto della ricerca sulla salute.

(3) Una lista di indicatori selezionati presentato nella Master Scorecard CRIF. La Master Scorecard CRIF identifica gli indicatori rilevanti per le parti interessate per misurare l'impatto della ricerca sulla salute; questo rapporto si concentra in

particolare sul processo di co-creazione di scorecard CRIF. Esplora inoltre gli indicatori applicabili alle dimensioni del CRIF nella rete di parti interessate che comprendono organizzazioni di pazienti, organizzazioni del settore sanitario e industria al fine di costruire priorità condivise per la misurazione dell'impatto.

Questo progetto ha evidenziato la necessità di trovare nuove misure per l'impatto della ricerca sulla salute usando un approccio collaborativo e coinvolgendo attivamente i pazienti nel processo. La letteratura sugli indicatori attualmente utilizzati evidenzia che, tradizionalmente, la dimensione più rappresentata è 'l'eccellenza' della ricerca seguita da indicatori relativi alla "missione" e, infine, gli indicatori che coprono questioni economiche o sociali. Ciò suggerisce che gli indicatori attualmente utilizzati enfatizzano l'eccellenza della ricerca nella valutazione della ricerca sanitaria e delle iniziative

di innovazione, rispetto alle altre dimensioni. In altre parole, non viene dato abbastanza spazio alle dimensioni relative agli outcome sociali e riportati dai pazienti.

Inoltre, le interviste condotte nello studio mostrano che gli intervistati hanno percepito un forte legame tra le dimensioni dell'eccellenza della ricerca e della missione, poiché la missione è considerata la base per intraprendere ricerche eccellenti. Allo stesso modo, i risultati delle interviste mostrano che le dimensioni sociale ed economica sembrano essere strettamente intrecciate, poiché si ritiene che il miglioramento della qualità della vita dei pazienti con SM abbia benefici economici più ampi e impatti socio-economici a lungo termine. Tutti gli intervistati hanno sottolineato l'importanza della prospettiva del paziente nel misurare gli impatti della ricerca sulla salute.

Accountability and multiple-constituency approach to measure impact of research

Traditional forms of accountability and measurement of the impact of research are focused in the priorities of stakeholders with economic and financial interest regarding the research process. There is a call to find new and appropriate metrics to evaluate research impact on people with MS following a multi-stakeholder approach. Conventional metrics normally are not able to represent different claims of different actors. Economical and financial dimension (efficiency) have to be integrated with the measures that relate to achieving mission success (efficacy) and being accountable to all the stakeholders who are directly or indirectly affected by an organization's activity. From a single stakeholder perspective, the paradigm needs to shift toward co-evaluation and involvement of all the interested parties in joint discussion for mutual learning and collaborative understanding of research outcomes measurement. The finding of new metrics is instrumental in enabling the finalization of common objectives (common research agenda) and at same time Return of Investment (ROI) by each involved stakeholder, also in a view of integrated sustainability.

Overall, the aim of the project is to develop a new model of accountability to be applied to the MS organizations as an accountability tool for evaluating their performance in a comprehensive manner. Additionally, the model aims to be a tool to be adopted, not only but with particular emphasis, by MS Societies towards better decision-making in the design of policies, agendas, funding programmes, evaluation procedures, and other strategic aspects.

The framework for operationalizing of co-accountability is the collective research impact framework (CRIF). Attempt-

ing to be holistic and having a sustainable approach, CRIF considers five dimensions: mission, excellence, efficiency, social and last but not least, the fifth dimension is the patient-reported dimension.

In parallel with a theoretical development of the co-accountability and the CRIF, the project yielded three main outcomes:

(1) The systematic identification of currently used measures of the impact of research presented in Database 1.0. The indicators identified through the literature review were compiled into a Database 1.0, which contains altogether 1,544 indicators.

(2) The analysis of expert's opinions carried through interviews strategic for the selection of more relevant indicators. Eight pilot interviews in MULTI-ACT's External Advisory Board (EAB) were undertaken between December 2018 and February 2019. The interviews followed a semi-structured interview protocol developed with the specific purpose of exploring (i) the stakeholders' perception of health research impact, and (ii) the accountability indicators to assess this impact. The findings reported in aforementioned interviews were instrumental for the co-creation of the CRIF scorecard through the selection of most relevant indicators of health research impact.

(3) A catalog of selected indicators presented in the CRIF Master Scorecard. The CRIF Master Scorecard identifies the relevant stakeholder-oriented indicators for measuring the impact of health research; this report especially focuses on the process of co-creation of CRIF scorecards. It explores indicators applicable to the CRIF dimensions in the network of

stakeholders comprising patient organizations, health sector organisations and industry in order to build shared priorities for impact measurement.

This project highlighted the need of finding new measures for the impact of health research using collaborative approach and putting patients at the centre of the process. The literature of currently used indicators provides evidence that, traditionally, the dimension most represented is knowledge and research benefits ("excellence"), followed by indicators related to the health sector benefits ("mission") and, finally, indicators covering economic or social issues. This suggests that currently used indicators emphasize research excellence when evaluating health research and innovation initiatives, compared to the other dimensions. In other words, do not

give enough room for social and patient reported outcomes dimensions.

Additionally, the interviews carried in the study shows that interviewees perceived a strong linkage between the dimensions of research excellence and mission, as the mission and team mission governance were considered to provide the rationale for undertaking excellent research. Likewise, the outcomes of the interviews show that the social and economic dimensions appear to be strongly intertwined, since improving the quality of life of MS patients was believed to have broader economic benefits and long term socio-economic impacts. All the interviewees emphasized the importance of the patient perspective in measuring the impacts of health research.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Antonini C, Costa E, Andreaus M. *The use of multi-stakeholder approach for tailoring an integrated accounting model*. XI CSEAR Spain Conference, Zaragoza, Spain, 4-5 September 2017
- Antonini C, Costa E, Andreaus M. *Accountability as a post-normal science*. 22nd EMAN conference, Galati, Romania, June 22nd-23rd, 2018
- Antonini C, Costa E, Andreaus M. *Co-accountability: a post-normal accountability framework for stakeholder engagement towards sustainability*. 30th ICSEAR, Saint Andrews, Scotland, August 29-30th, 2018
- Antonini C, Costa E, Andreaus M. *Co-Accountability: a post-normal accountability framework for stakeholder engagement towards sustainability*. Post normal Science Symposium, Barcelona, Spain, November 14-15th, 2018
- *Post Normal Science: Exploring collective accountability, Debate*: Silvio Funtowicz, Jan Bebbington, Den Patten, Annibale Biggeri y Paola Zaratini. Organizers: Andreaus M, Costa E, Antonini C, Garcia Torea N. Trento, Italy, March 5th, 2019
- Antonini C, Costa E, Andreaus M, Pesci C. *Multiple epistemologies in accountability and the role of post normal science in shaping Co-accountability*. APIRA 2019, Auckland, New Zealand, July 1st-3rd, 2019
- Antonini C, Costa E, Andreaus M, Pesci C. *Multiple epistemologies in accountability and the role of post normal science in shaping Co-accountability*. XII Spain CSEAR, Pamplona, Spain, September 11-13th, 2019

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 50.000 €
FISM Special Project funded in 2017 and the amount of € 50,000

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, Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

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*

Paolo Confalonieri, Rui Quintas, *Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

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*

Michele Messmer Uccelli, *Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM), Genova*

Il processo di adattamento alla sclerosi multipla (SM) può essere particolarmente 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 effi-

cace 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).

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 in-

intervento di controllo attivo (rilassamento). 37 persone con SM sono state assegnate casualmente a uno dei due interventi (1:1 ratio). Sono stati raccolti dati quantitativi (tramite questionari; al basale, subito dopo l'intervento e a tre mesi) e qualitativi (tramite interviste) sull'esperienza dei partecipanti e confrontato l'effetto dei due interventi nel tempo. La maggior parte dei partecipanti (indipendentemente dal tipo di intervento 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 QoL a tre mesi dalla fine del programma. I partecipanti al READY for MS hanno ottenuto risultati in linea con i dati degli studi australiani.

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. Il fatto che i partecipanti avessero gradi diversi di disabilità (EDSS= 0-6.5) supporta il fatto che il programma sia utile e facilmente implementabile in questa popolazione. Tutti i partecipanti raccomanderebbero il programma READY for MS ad 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 nel migliorare il funzionamento dei partecipanti. Questo risultato è in contrasto con i dati qualitativi che dimostrano la sua superiorità rispetto al rilassamento per l'impatto sulla vita quotidiana, 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 ha permesso di formare psicologi della "Rete psicologi AISM" alla conduzione di gruppi READY for MS e di valutare l'effetto del training sul loro funzionamento psicologico. Durante il training gli psicologi hanno partecipato a un workshop introduttivo sull'ACT, a un gruppo READY

adattato per loro e, infine, condotto un gruppo READY for MS con persone con SM nella loro Sezione AISM o Centro SM. 44 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. Tutti i partecipanti hanno superato con successo l'esame sulle competenze e si sono detti estremamente soddisfatti dell'esperienza. Lo Studio 3 origina dall'ultima fase del training, quella in cui gli psicologi hanno condotto un gruppo READY for MS con persone con SM. Alle persone con SM che hanno preso parte al gruppo è stato chiesto di compilare un set di questionari (al basale, subito dopo l'intervento e a tre mesi). L'inserimento dati è in corso. Questo studio permetterà di valutare l'effetto del programma READY for MS quando condotto nei normali servizi territoriali (Sezione AISM o Centro SM). Le azioni portate avanti finora sono state propedeutiche alla definizione del protocollo dello studio multicentrico randomizzato controllato (Studio 4) che valuterà l'efficacia del programma READY for MS. La definizione dei centri partecipanti è in corso, l'arruolamento dei partecipanti comincerà a settembre 2020.

Il programma READY for MS è stato in grado di migliorare la resilienza, il tono dell'umore e la flessibilità psicologica dei partecipanti. I dati qualitativi (ma non quantitativi) supportano la maggior efficacia del programma rispetto a un trattamento standard come il rilassamento. I dati del pilota (Studio 1) sono serviti a disegnare lo studio multicentrico che seguirà. Inoltre, i risultati dello Studio 2 suggeriscono che il training rivolto agli psicologi della "Rete psicologi AISM" abbia avuto un impatto positivo, sia a livello professionale che personale e che il programma READY for MS sia facilmente implementabile sia nelle Sezioni AISM che nei Centri SM italiani.

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)

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 health 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).

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 in a 1:1 ratio. Both quantitative (questionnaire; at baseline, post intervention and a three month follow-up) and qualitative information (personal interview) on participants' experience were collected. 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). In addition, the improvements evident in the READY for MS sample are in line with those shown in the Australian sample (improvement in mood, resilience and psychological flexibility $p < 0.01$), three months after program completion. Both qualitative and quantitative data showed that all READY for MS participants were satisfied with the program and its materials, and the majority had a good level of engagement. 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. Noteworthy is the wide variation in disease severity (EDSS=0-6.5) among the READY for MS participants which supports its utility and acceptability in this population. 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 pi-

lot 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 evaluates the READY for MS health practitioner training program that allow to train psychologist of the Italian MS Network in running a READY for MS group. The training has the following 3 major components: Training introductory workshop on ACT; Training that involves participating in the READY Program (adapted version for psychologist); Training that involves supervised delivery of the READY for MS Program to PwMS. Data were collected via questionnaires immediately before the workshop, before the beginning of, and after the participation in READY, and at 3-month follow-up. Forty-four psychologists successfully completed the first two phases of the training, forty were able to run a READY for MS group with people with MS in their territory (AISM branch or MS centre). The sample showed significant improvements in resilience, well-being, mood and psychological flexibility ($p < 0.001$) that were maintained at three and 15-month follow-up. All the participants obtained good results in the knowledge exams and were highly satisfied with the training. Study 3 evaluates the effectiveness of the READY program when delivered in the community by a range of health practitioners trained in the intervention. Participants with MS were asked to fill in a set of questionnaire (same of Study 1) at baseline, at the end of the intervention and at three-month follow-up. Data analysis is ongoing. Our findings informed methodological and intervention refinements for the multi-centre randomized controlled trial that will follow (Study 4). Selection of participating centres is ongoing and participants enrolment starts in September 2020.

The Italian READY for MS is well accepted by MS patients with varied socio-demographic and clinical characteristics. It improves participants resilience, mood and psychological flexibility. Qualitative (but not quantitative) data provide evidence in favour of READY for MS over other standard psychological intervention (i.e. relaxation) and provide critical information to design the multi-centre randomized controlled trial that will follow.

Moreover, results from Study 2 suggested that the training was personally and professionally helpful for the MS psychologists and the integration of program delivery within patients' association branches and MS Centres was effective.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- Giovannetti, A.M., 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, A.M., Quintas, R., Matarrozzi, 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
 - Giovannetti, A.M., Quintas, R., Tramacere, I., Giordano, A., Confalonieri, P., Messmer Uccelli, M., Solari, A., Pakenham, K. A resilience group training program for people with MS: results of a pilot single-blind randomized controlled trial and nested qualitative study (under review)
- Conferenze e presentazioni orali / Conference and Oral Presentations**
- Giovannetti, A.M., 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 2018
 - Giovannetti, A.M., 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 - 30th 2018
 - Giovannetti, A.M. 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, A.M. 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, A.M. 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, A.M., 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, A.M., 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 20th - 22nd 2019
 - Giovannetti, A.M. 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

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 222.000 €
FISM Special Project funded in 2017 and the amount of € 222,000

A new functional profile to monitor the progression of disability in MS (PROMOPRO-MS)



Giampaolo Bricchetto

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Margherita Monti Bragadin, Mario Alberto Battaglia, Michela Ponzio, Ludovico Pedullà, Andrea Tacchino

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Samuele Fiorini, Alessandro Verri, Annalisa Barla, Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica, e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università degli Studi di Genova, Genova

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 Outcome (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 attivo "A new functional profile to monitor the progression of disability in MS" (PROMOPRO-MS, Progetto speciale FISM) 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 la SM, migliorare la detezione del decorso di malattia, predire la progressione della malattia e identificare i migliori predittori di malattia.

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'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. Ciononostante, 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. Tuttavia, nuovi studi sono necessari.

A new functional profile to monitor the progression of disability in MS (PROMOPRO-MS)

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 more steady 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 project "A new functional profile to monitor the progression of disability in MS" (PROMOPRO-MS, a

FISM special call) 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.

Since 2013 PROMOPRO-MS constitutes a growing cohort of people with MS (PwMS). To date, we collected more than 5,000 evaluations from about 1,100 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. Nevertheless, 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. However, new studies are necessary.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Brichetto 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*

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 480.000 €
FISM Special Project funded in 2013 and the amount of € 480,000

Quali fattori influenzano la percezione di competenza del genitore con sclerosi multipla?



Michele Messmer Uccelli

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Michela Ponzio, Silvia Traversa

La sclerosi multipla (SM) colpisce in particolare il giovane adulto, in età fertile. La persona può quindi ricevere la diagnosi quando i figli dipendono ancora in tutto o in parte dal genitore, anche per i bisogni primari.

In molti casi, la diagnosi di sclerosi multipla può precedere o seguire di poco il momento del parto, caratterizzando perciò fin da subito l'esperienza della genitorialità.

Essere genitore è stressante e impegnativo e il successo di questa esperienza può essere minacciato dalla presenza di una malattia cronica come la SM.

Il percorso di genitorialità può essere interrotto o aggravato dal progredire della malattia o dal peggioramento di alcuni sintomi che caratterizzano la SM, in particolare disturbi dell'umore, dolore, disturbi cognitivi, fatica e difficoltà motorie.

La competenza genitoriale percepita si riferisce alle capacità e alle abilità che lui o lei ritengono necessarie per prendersi cura di un bambino e più in generale per essere un buon genitore. Essere soddisfatti del proprio ruolo è un elemento importante che influenza la percezione che si ha della propria competenza genitoriale.

Il modo in cui le persone giudicano la propria capacità genitoriale influenza la percezione che hanno di loro stessi. In presenza di una malattia cronica come la SM, la percezione della propria competenza di essere genitori può essere influenzata da diversi fattori come le ricadute, la presenza di limiti fisici, la fatica e altre difficoltà emotive legate all'esperienza di avere una malattia cronica.

Obiettivo dello studio era identificare i fattori che influenzano la percezione che i soggetti con SM hanno della propria competenza genitoriale, incluse caratteristiche di malattia e demografiche, fattori emotivi, qualità della vita, supporto sociale e strategie di coping.

I soggetti coinvolti erano genitori con SM con almeno un figlio/a di età non superiore ai 18 anni, reclutati attraverso i canali social media di AISM.

I dati sono stati raccolti attraverso un questionario anoni-

mo online che includeva le seguenti scale di valutazione: Parenting Sense of competence (PSOC), Multidimensional Scale of Perceived Social Support (MSPSS), 12-Item Short Form Health Survey (SF-12), Brief Coping Orientation to Problems Experienced (COPE) questionnaire, Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS). Sono stati inoltre raccolti dati demografici.

Al fine di valutare la relazione tra queste variabili e la percezione di competenza rispetto al ruolo dei soggetti coinvolti, sono state condotte analisi univariata e multivariata. Lo studio è stato condotto su un gruppo di 285 genitori con sclerosi multipla. 234 partecipanti erano donne (82.1%). I soggetti avevano una età compresa tra 22 e 55 anni con una età media di 41 (DS 6.8) anni. Il grado di istruzione variava dalla scuola primaria all'università, la maggioranza dei partecipanti aveva un alto livello di istruzione (49,5%). Il 57% dei genitori (n=161) aveva un lavoro. Il punteggio EDSS era compreso tra 0-9 e circa i due-terzi del campione (62.5%) avevano un EDSS<4.

Il punteggio medio della sottoscala HADSa dell'ansietà è risultato pari a 8.5 (DS 3.9) e quello della depressione (HADSd) a 5.6 (DS 3.6). Circa il 59% e il 31% dei soggetti hanno riportato sintomi clinicamente significativi (punteggio ≥8) legati rispettivamente ad ansia e depressione.

Rispetto alla scala della qualità della vita SF-12, il punteggio medio del PCS (componente fisica) è stato di 40.6 (DS 11.7) mentre quello MSC (componente emotiva) è stato di 39.9 (DS 11.7). La media MSPSS è risultata pari a 4.4 (DS 1.0). Rispetto alla scala COPE, i soggetti hanno dimostrato più frequentemente un atteggiamento focalizzato su problem-focused e emotion-focused coping, piuttosto che dysfunctional coping.

Nell'analisi multivariata sono state inserite le variabili risultate significative ($p < 0.20$) nell'analisi univariata. Il modello finale ha evidenziato come fattori correlati a una più bassa percezione di competenza un'età più elevata dei genitori ($p < 0.002$), valori più elevati di HADSa ($p = 0.012$), HADSd

($p=0.001$) e COPE Brief dysfunctional coping ($p=0.005$). Inoltre, valori più elevati di problem-focused coping ($p=0,029$) e di qualità della vita (PCS, $p=0.006$ e MCS, $p<0.001$), erano correlati a punteggi di PSOC più alti.

La significatività statistica non è stata mantenuta rispetto alla relazione tra il PSOC e l'MSPSS, strategie di gestione degli aspetti emotivi e livello di disabilità.

I risultati di questo studio aiutano a colmare una lacuna rispetto alle attuali conoscenze in materia di capacità genitoriale e soddisfazione nell'esercizio del ruolo di genitore con la SM.

Vivere con una malattia cronica, in particolare nelle fasi di ricaduta o quando si sperimentano sintomi invalidanti, può avere un impatto sui genitori e, di conseguenza, sul senso di adeguatezza rispetto al ruolo.

I fattori che hanno mostrato una correlazione più significativa con la percezione che i soggetti hanno della propria capacità genitoriale sono per la maggior parte modificabili. Ansia e depressione nella SM possono essere entram-

be efficacemente trattate mediante interventi psicologici e farmacologici.

Una diagnosi e un trattamento tempestivi dei disturbi dell'umore possono influenzare indirettamente la percezione di capacità e il senso di soddisfazione del genitore. Inoltre, è evidente che con il passare del tempo i soggetti con sclerosi multipla possono imparare nuove ed efficaci strategie di coping, nonché mettere in atto comportamenti per affrontare al meglio le sfide poste dalla propria condizione di salute.

Infine, è importante sottolineare che la percezione di competenza, rispetto al ruolo dei genitori con SM, appare strettamente connessa con la qualità di vita correlata allo stato di salute, un'area in cui vi sono evidenze significative rispetto alla possibilità di ottenere un miglioramento combinando una terapia cognitivo-comportamentale a interventi di autogestione.

What factors influence feeling competent as a parent with multiple sclerosis?

Multiple sclerosis (MS) is typically diagnosed in early adulthood, during childbearing years. This means that an individual can face the diagnosis when children are more or less dependent upon them for the physical aspects of care. In many cases, the diagnosis can immediately precede or follow the birth of a child and therefore can be a concomitant feature of the parenting experience. It is stressful and demanding to be a parent and the success of parenting can be threatened by a chronic illness like MS. Parenting can be disrupted by exacerbations, disease worsening and by many of the symptoms characteristic of MS, particularly mood disorders, pain, cognitive impairment, fatigue and mobility problems. Perceived parental competence refers to the parent's perception of possessing the skills he or she needs to care for a child and the ability to parent successfully. Satisfaction in the parenting role is a component of perceived parental competence. Beliefs and judgements parents have of their abilities to carry out parenting tasks influence this self-perception. In a chronic illness like MS, an individual's perception of his or her parenting competence can be influenced by relapses, physical limitations, fatigue and the emotional difficulties related to having a chronic illness.

The aim of the study was to identify factors that influence the perception individuals with MS have of their competence in parenting, including disease and demographic characteristics, mood, quality of life, social support and coping strategies.

Subjects were parents of a child with a maximum of 18 years of age recruited through AISM social media channels. Data were collected using an anonymous online questionnaire and included the following scales: Parenting Sense of Competence (PSOC), Multidimensional Scale of Perceived Social Support (MSPSS), 12-Item Short Form Health Survey (SF-12), Brief Coping Orientation to Problems Experienced (COPE) questionnaire, Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS). Demographic information was also collected. Univariate and multivariate analyses were performed to assess associations between these variables and subjects' perception of parenting sense of competence.

The study group consisted of 285 parents with MS. Two hundred and thirty-four participants were female (82.1%). The age range was 22 to 55 years, with a mean of 41 (SD 6.8) years. Educational levels ranged from primary school to university, with the majority of participants obtaining a high school level education (49.5%). Fifty-seven percent of parents ($n=161$) were employed. EDSS score ranged from 0-9.0 and approximately two-thirds of the sample (62.5%) had an EDSS <4 .

The mean HADS anxiety subscale score was 8.5 (SD 3.9) and the depression subscale scores was 5.6 (SD 3.6). Approximately 59% and 31% of subjects reported clinically significant symptoms (score of ≥ 8) of anxiety and depression, respectively. On the SF-12, the mean PCS was 40.6 (SD 11.7) and the mean MCS was 39.9 (SD 11.7). The mean MSPSS

score was 4.4 (SD 1.0). On the COPE scale, subjects more frequently reported the use of problem-focused (mean 5.1, SD 1.2) and emotion-focused (mean 4.7, SD 1.0) coping than dysfunctional coping (mean 3.6, SD 0.8).

In the multivariate analysis independent determinants of lower scores on the PSOC were similar to those observed in the univariate analysis, including HADS anxiety ($p=0.012$), HADS depression ($p=0.001$) and COPE Brief dysfunctional coping ($p=0.005$). Older parent age also correlated with lower PSOC ($p=0.002$). COPE Brief problem-focused coping ($p=0.029$) and the physical and mental components of the SF-12 ($p=0.006$, $p <0.001$ respectively) were related to higher PSOC scores. Statistical significance was not maintained for the relationship between the PSOC and the MSPSS, emotional-focused coping and level of disability.

The results from this study help to address a gap in our previous knowledge regarding competence and role satisfaction related to parenting with MS. Living with a chronic

illness, particularly during relapses or when individuals experience distressing symptoms, could impact parenting and as a consequence the perception one has of being a capable parent. The factors that most significantly correlated with the perception of parenting competence are for the most part modifiable. Both anxiety and depression in MS can be successfully treated through psychological and pharmacological interventions. Timely diagnosis and treatment of mood problems could indirectly influence sense of competence and satisfaction in the parenting role. Further, there is evidence that people with MS can learn new effective coping strategies and adapt coping strategies over time to better face challenges related to their health. Finally, it is important to recognize that parents' sense of competency appears to be correlated with health-related quality of life, an area where there is significant evidence that improvement is attainable with cognitive-behavioral therapy combined with self-management interventions.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- Messmer Uccelli M, Ponzio M, Traversa S. What factors influence feeling competent as a parent with multiple sclerosis? *Chronic Illn.* 2019 Dec 22:1742395319895310. doi: 10.1177/1742395319895310
- Messmer Uccelli M, Ponzio M. A case-control study assessing parenting sense of competence in people with multiple sclerosis. *Rehabil Psychol.* 2018 Aug;63(3):431-437. doi: 0.1037/rep0000211
- Ponzio M, Messmer Uccelli M. Coping strategies in parents with multiple sclerosis: a case-control study. XLIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Neurologia (SIN). Rome 27-30th October, 2018

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2018 e l'ammontare di 30.000 €
FISM Special Project funded in 2018 and the amount of € 30,000

MAppingMS: un'App per monitorare lo stato fisico, cognitivo e emotivo di persone con sclerosi multipla



Giampaolo Bricchetto

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Andrea Tacchino, Margherita Monti Bragadin, Mario Alberto Battaglia, Ludovico Pedullà

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Vittorio Tauro, Simone Tonti, Emanuele d'Amico, Maria Bulgheroni, Ab.Acus srl, Milano

Negli ultimi anni è sempre più in evidenza la necessità di efficienza dei sistemi sanitari nonostante la carenza di risorse disponibili. Questa necessità di bilanciare la qualità dei servizi forniti con le poche risorse disponibili è di stimolo alla definizione di nuove modalità di erogazione dei servizi sanitari che consentano, in tempo reale, il controllo e la valutazione sistematica di parametri quali il rischio clinico, le procedure diagnostiche e terapeutiche con particolare riferimento alla qualità delle stesse, alle risorse impiegate, alle tecnologie utilizzate e al livello di soddisfazione percepito dal cittadino.

Per le persone affette da malattie croniche e neurodegenerative, inclusa la sclerosi multipla (SM), è giunto il tempo di cambiare paradigma terapeutico passando dal trattamento terapeutico tradizionale alla autosomministrazione di trattamenti personalizzati, per una autogestione della malattia.

MAppingMS ambisce a implementare un sistema di monitoraggio delle attività fisiche, cognitive ed emotive di una persona affetta da SM, per una sua autogestione della patologia. Il sistema utilizza un'app per smartphone e aiuterà le persone con SM (PcSM) a controllare il loro livello di attività fisica, di prestazione cognitiva e l'andamento della loro sfera emotiva nella quotidianità ed è predisposto ad indurre, quando necessario, un cambiamento comportamentale o l'intervento del clinico e della figura sanitaria di riferimento.

Inoltre è da tenere in considerazione come negli ultimi anni, accanto all'uso delle informazioni provenienti dai sensori presenti negli smartphone per definire il profilo fisico, cognitivo, emotivo di una persona con SM, si è andato a diffondere l'interesse per l'uso di grandi database di questionari (PRO), valutazioni cliniche (CAO) e misure di performance (PM).

Fatte queste considerazioni, in un primo studio sull'u-

so dell'app sviluppata in MAppingMS, abbiamo svolto lo user-test dell'app su 13 soggetti sani (HS; F=8) e 10 PcSM (F=7; RR=6, SP=4), monitorate per un mese, 24 ore al giorno. Abbiamo poi correlato le misure ottenute attraverso i sensori con i valori di PRO, CAO e PM.

Tutti i partecipanti erano destrimani e i due gruppi non erano significativamente differenti per età (HS: $43 \pm 6.62y$; PwMS: $49 \pm 10.91y$). HS erano fisicamente più attivi delle PcSM come mostrato da un indice ottenuto dai sensori di movimento: le differenze in tale indice erano presenti in tutti e quattro gli slot temporali di 6 ore considerati (0-6h, HS: 796.83 ± 329.03 , PwMS: 9.65 ± 16.74 ; 6-12h, HS: 7646.50 ± 6949.62 , PwMS: 721.18 ± 1118.57 ; 13-18h, HS: 9860.20 ± 7903.04 , PwMS: 864.45 ± 1139.95 ; 19-24h HS: 7948.89 ± 7443.61 , PwMS: 372.76 ± 394.51 ; sempre $p < 0.05$). L'indice di attività fisica correlava con l'indipendenza funzionale misurata con la FIM (Spearman $\rho = 0.71$, $p < 0.05$). Inoltre, ogni distinto periodo di uso del telefono era significativamente più lungo nelle PcSM (HS: $158.81 \pm 89.75s$, PwMS: $469.51 \pm 479.99s$; $p < 0.05$) come era deducibile dal tempo di accensione dello schermo; il declino cognitivo nella capacità di processamento dell'informazione potrebbe dare una spiegazione a questo risultato. Infine, le PcSM spendevano significativamente più tempo nelle chiamate (HS: $62.12 \pm 41.56s$, PwMS: $188.87 \pm 203.53s$; $p < 0.05$), probabilmente per affrontare come possibile l'inevitabile ritiro sociale.

Sebbene siano necessari maggiori approfondimenti, specifici profili fisici, cognitivi ed emotivi delle PcSM sembrano essere identificabili attraverso un'app appositamente sviluppata per il monitoraggio delle PcSM. Maggiori e più definitive considerazioni potranno essere fatte dopo aver esteso il campione. Solo allora si potrà evidenziare maggiore precisione anche per distinte forme di SM.

MAppingMS: an App to monitor physical, cognitive and mood status of people with Multiple Sclerosis

Increasing evidences on Public Health Systems efficiency and on the limits of resources available for therapeutic intervention indicate that, for people suffering from chronic and progressive neurological diseases, including people with multiple sclerosis (PwMS), the time is right to shift from the traditional therapeutic paradigm towards a personalized disease self-administration. PwMS are not a homogeneous population, and their difficulties and needs vary according to the individual experiences of the disease, the personal symptoms and the disease stage, indicating the need for a personalized management of MS. Home based and accessible measures and tools for evaluating changes in mobility, cognitive function and mood would be of great benefit to PwMS, as well as neurologists, psychiatrists and therapists of integrated care.

MAppingMS implements a continuous monitoring of physical, cognitive and emotional status for the disease self-management of PwMS and is based on an app for smartphones. New pathways of MS management and, consequently, new approaches of interventions could supplement traditional therapeutic programmes. The final aim of MAppingMS project is the development of a system able to support PwMS to check their level of performance in the daily life and to induce, when needed, a behavioral change or an intervention from healthcare professionals. In the last years, beside the use of smartphone sensors data to depict physical, cognitive and social profiles and check potential meaningful variations over time of PwMS, there has been a growing interest in using patient reported outcomes (PRO), clinical assessments outcomes (CAO) and performance measures (PM) as the Italian initiative PRO-MOPROMS demonstrates.

Due to these considerations, in a first study on the use of the MAppingMS app we user-tested the app on 13 healthy subjects (HS; F=8) and 10 PwMS (F=7; RR=6, SP=4) for 1 month acquiring data 24hours/7days, and we correlated the variables obtained through the sensors monitoring with PRO, CAO and PM at baseline.

All the participants were right-handed and the two groups were not significant different for age (HS: $43 \pm 6.62y$; PwMS: $49 \pm 10.91y$). HS were physically more active than PwMS as shown through an index taking into account all the motion sensors; differences were present in all the four considered 6-hour time slots (0-6h, HS: 796.83 ± 329.03 , PwMS: 9.65 ± 16.74 ; 6-12h, HS: 7646.50 ± 6949.62 , PwMS: 721.18 ± 1118.57 ; 13-18h, HS: 9860.20 ± 7903.04 , PwMS: 864.45 ± 1139.95 ; 19-24h HS: 7948.89 ± 7443.61 , PwMS: 372.76 ± 394.51 ; always $p < 0.05$). The activity index was correlated with functional independence measured with FIM (Spearman $\rho = 0.71$, $p < 0.05$). Moreover, each single smartphone use was significantly longer in PwMS (HS: $158.81 \pm 89.75s$, PwMS: $469.51 \pm 479.99s$; $p < 0.05$) as deducible from the screen brightness time; cognitive decline in information processing could explain this results. Finally, PwMS significantly spent more time in incoming call (HS: $62.12 \pm 41.56s$, PwMS: $188.87 \pm 203.53s$; $p < 0.05$), probably to face the social withdrawal due to MS.

Although more investigations are needed, specific physical, cognitive and social profiles of PwMS seem to be detectable through a customized developed monitoring app. More definitive considerations need a larger sample to be evaluated, especially to provide also ad hoc information for relapsing remitting and secondary progressive patients.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Brichetto G, Pedullà L, Podda J, Tacchino A. *Beyond center-based testing: Understanding and improving functioning with wearable technology in MS. Mult Scler.* 2019 Sep;25(10):1402-1411. doi: 10.1177/1352458519857075
- Pedullà L, Brichetto G, Tacchino A, Vassallo C, Zaratini P, Battaglia MA, Bonzano L, Bove M. *Adaptive vs. non-adaptive cognitive training by means of a personalized App: a randomized trial in people with multiple sclerosis. J Neuroeng Rehabil.* 2016 Oct 4;13(1):88
- Tacchino A, Pedullà L, Bonzano L, Vassallo C, Battaglia MA, Mancardi G, Bove M, Brichetto G. *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. doi: 10.2196/mhealth.4269

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2016 e l'ammontare di 195.238 €
FISM Special Project funded in 2016 and the amount of € 195,238

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 NEUROFARBA, Università degli Studi di Firenze, Firenze

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Luisa Pasto, Lorenzo Razzolini, Elio Prestipino, Benedetta Goretti, Claudia Niccolai

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI/ COLLABORATION WITH OTHER GROUPS

Mauro Zaffaroni, Lorena Pippolo, Marco Roscio, *Centro SM, ASST della Valle Olona Presidio Ospedaliero di Gallarate, Gallarate, Varese*

Maria Trojano, Rosa Gemma Viterbo, Marta Simone, *Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli Studi Aldo Moro di Bari, Bari*

Eleonora Cocco, Giuseppe Fenu, *Centro SM, Ospedale Binaghi, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari*

Giancarlo Comi, Lucia Moiola, Monica Falautano, *Università Vita-Salute San Raffaele, Milano*

Giovanni Mancardi, *Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Genova, Genova*

Ruggero Capra, *Centro Regionale SM Presidio di Montichiari, Spedali Civili di Brescia, Brescia*

Renzo Guerrini, Federico Melani, *Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze*

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 manifesta 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 ad 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 proposito, 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.

Il training è stato somministrato a un gruppo di 15 controlli sani (5 Maschi, 10 Femmine con età media di 14.8 con deviazione standard di 2.21 e un età media di scolarizzazione di 12,3) per la messa a punto dell'applicazione (compliance e fattibilità).

Ad oggi tutti i centri coinvolti nello studio hanno ottenuto l'approvazione del Comitato Etico.

La tabella 1 riassume lo stato di arruolamento dei pazienti (Pz).

TABELLA 1. CENTRI PARTECIPANTI E STATO DELL'ARRUOLAMENTO

CENTRI PARTECIPANTI	PZ SCREENATI	PZ ARRUOLATI
<i>Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer</i>	5	5
<i>Università degli Studi di Bari</i>	8	8
<i>Spedale Civile di Brescia</i>	3	3
<i>Università degli Studi di Cagliari</i>	0	0
<i>Ospedale San Antonio Abate, Gallarate</i>	2	1
<i>Università degli Studi di Genova</i>	0	0
<i>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano</i>	0	0

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

Onset of multiple sclerosis (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 pro-

ved 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. After a preliminary phase, necessary for the fine-tuning of the application, its preliminary test on a limited sample of healthy and sick subjects, the study foresees a common training phase for the operators involved, to standardize the neuropsychological evaluation of the subjects among the centres, and the instructions to be provided for the use of the application. Then the implementation

of the randomized trial, the follow up of the subjects, the analysis and publication of the results. The training was administered to a group of 15 healthy controls (5 Male, 10 Females with a mean age of 14.8 and SD of 2.21; Mean education, years 12.3) for the development of the application (compliance and feasibility).

To date, all the centers involved in the study have obtained approval from the Ethics Committee.

Table 1 summarizes the enrollment status of patients (Pt).

TABLE 1. ENROLLMENT STATUS

PARTICIPATING CENTERS	PT SCREENED	PT ENROLLED
<i>Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer</i>	5	5
<i>Università degli Studi di Bari</i>	8	8
<i>Spedale Civile di Brescia</i>	3	3
<i>Università degli Studi di Cagliari</i>	0	0
<i>Ospedale San Antonio Abate, Gallarate</i>	2	1
<i>Università degli Studi di Genova</i>	0	0
<i>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano</i>	0	0



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- 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 FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 220.000 €
FISM 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

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Mario Stampanoni Bassi, Ennio Iezzi, Ilaria Simonelli, *IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (IS)*

Luana Gilio, *IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (IS), Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma*

Francesca Romana Rizzo, Antonietta Gentile, *Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma*

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'esercizio 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 favorire fenomeni di neuroprotezione e ripresa funzionale. In questi pazienti verrà 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 modulazione della plasticità sinaptica e dell'attività corticale e i livelli di TNF e IL-1b rilasciati dai linfociti T isolati dal sangue periferico. Inoltre, sfruttando il modello chimerico di incubazione di linfociti T di pazienti SM su fettine corticostriatali di topo valuteremo l'effetto dell'esercizio stesso sull'infiammazione e sulla sinaptopatia infiammatoria indotta dai linfociti T. In una prima fase di questo studio abbiamo identificato la popolazione SM target. Recentemente, attraverso il modello murino chimerico di SM abbiamo dimostrato come i linfociti dei pazienti SM recidivanti-remittenti (SMRR) in fase attiva siano in grado di causare sinaptopatia infiammatoria rilasciando la citochina proinfiammatoria TNF (Gentile et al, 2019). Considerato che i pazienti SM progressivi (PSM) sono i soggetti che maggiormente traggono beneficio dalla riabilitazione fisica, in alcuni casi unica terapia disponibile, e considerata la spiccata componente

neurodegenerativa della malattia nei PSM, abbiamo indagato l'effetto sinaptico dei linfociti di pazienti PSM. Le analisi condotte su 5 pazienti PMS non in trattamento farmacologico da almeno 3 mesi, hanno mostrato che i linfociti inducono sinaptopatia in maniera analoga a quella dei linfociti di pazienti SMRR attivi. Questo ci ha permesso di iniziare il reclutamento di pazienti PSM presso l'Istituto Neuromed (Pozzilli). Finora abbiamo reclutato 9 pazienti (5 femmine, 4 maschi; età media 55 ± 11), di cui sono ancora in corso le valutazioni al t1 e al t2. Sono in corso i reclutamenti di altri pazienti.

Tutti i pazienti reclutati, che hanno mostrato elevata compliance allo studio, sono sottoposti a un programma riabilitativo di 3 ore/giorno, 6 sedute/settimana per 4 settimane. L'approccio riabilitativo, sia passivo che attivo, è differente in base ai diversi livelli di disabilità dei pazienti. Un'avanzata terapia robotica viene utilizzata per standardizzare il trattamento riabilitativo e ottenere indici oggettivi delle funzioni motorie. Al t2 sono monitorati i livelli di disabilità clinica, i disturbi dell'umore e viene prelevato il sangue periferico per valutare l'attività sinaptica dei linfociti periferici e il rilascio di citochine. I soggetti finora studiati sono stati valutati con i test neurologici per inquadrare lo stato clinico e di disabilità (MRI, 9-HPT, 25-FOOT WALK), test neuropsicologici per esaminare lo stato cognitivo (SDMT, MSQOL) e lo stato psicologico principal-

mente dal punto di vista dell'umore (BDI-II, STAI-Y), infine test neurofisiologici effettuando uno studio di plasticità corticale (TMS).

L'analisi della concentrazione di TNF e IL1-b rilasciato dai linfociti T ai diversi time-points verrà realizzata tramite test ELISA al raggiungimento di un adeguato numero campionario. Lo studio dell'attività sinaptica dei linfociti T presi al t1 (dati preliminari) sembra indicare che l'esercizio fisico è in grado di migliorare l'attività sinaptica neuronale riducendo il danno eccitotossico prodotto dalle molecole proinfiammatorie rilasciate dai linfociti T. Le indagini elettrofisiologiche sono tuttora in corso.

Abbiamo dimostrato che i linfociti T di pazienti PSM sono in grado di indurre sinaptopatia infiammatoria, corroborando l'idea del loro coinvolgimento nella neurodegenerazione che caratterizza la SM. Il numero di pazienti sinora reclutati non ci consente di fare valutazioni statistiche sull'effetto dell'esercizio sui parametri clinici in studio (disabilità, TMS, scale di umore). L'ulteriore reclutamento e la conseguente raccolta dati permetteranno nel breve termine di fare le appropriate valutazioni. Gli studi sul modello chimerico, anch'esso ancora in corso, suggeriscono un effetto benefico dell'esercizio fisico sull'asse immuno-sinaptico e quindi il potenziale terapeutico dell'esercizio nei pazienti PSM.

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

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 therapeutic 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 thera-

pies. 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-b 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 corticostriatal mouse slices, we will evaluate the effect of the exercise on inflammation and inflammatory synaptopathy induced by T lymphocytes.

During the early phase of this study we identified the MS population target. Recently, by the means of the chimeric mouse model of MS we demonstrated that the lymphocytes of relapsing-remitting MS patients (RRMS) in the active phase are able to cause the inflammatory synaptopathy by releasing the pro-inflammatory cytokine TNF (Gentile et al, 2019). Considering that progressive MS patients (PSM) are the subjects that most benefit from physical rehabilitation, which in some cases is the only available therapy, and considering the marked neurodegenerative component of the disease in PMS, we investigated the synaptic effect of T lymphocytes of PMS patients. Data analysis from 5 PMS patients, without pharmacological treatment for at least 3 months, has shown that lymphocytes induce synaptopathy in a similar way to that from active RRMS patients.

This first evidence allowed us to start the recruitment of PMS patients at the Neuromed Institute (Pozzilli). We have recruited 9 patients (5 females, 4 males; aged 55 ± 11), whose assessments at t1 and t2 are still ongoing. More patient's enrollment is ongoing.

All recruited patients, who showed high compliance with the study, underwent a 3-hour/day rehabilitation program, 6 sessions/week for 4 weeks. The rehabilitative approach, both passive and active, is tightly tailored to patient's le-

vels of disability. An advanced robotic therapy is used to standardize rehabilitative treatment and to obtain more objective indexes of motor function. At t2, the level of clinical disability and mood disorders are monitored, and T cells are isolated from peripheral blood to evaluate the synaptic activity and the release of cytokines. The subjects studied so far have been evaluated through neurological tests to assess the clinical and disability status (MRI, 9-HPT, 25-FOOT WALK), through neuropsychological tests to examine the cognitive status (SDMT, MSQOL) and the psychological status (BDI-II, STAI-Y), by the means of neurophysiological tests to study cortical plasticity (TMS). The analysis of the levels of TNF and IL1-b released by T cells at the different time-points will be carried out by ELISA when an adequate sample size is reached. The study of T cell mediated synaptic activity at t1 (preliminary data) suggests that exercise is able to improve synaptic transmission by reducing the excitotoxic damage caused by the proinflammatory molecules released by T lymphocytes. The electrophysiological investigations are ongoing.

We have shown that the T lymphocytes of PMS patients are able to induce inflammatory synaptopathy, corroborating the idea of their involvement in the neurodegeneration that characterizes MS. The number of patients recruited so far does not allow us to make statistical assessments on the effect of exercise on clinical parameters in the study (disability, TMS, mood scales). The further recruitment and the consequent data collection will allow further assessments in the short term. Studies on the chimeric model, still undergoing, suggest a beneficial effect of exercise on the immune-synaptic axis and therefore the therapeutic potential of exercise in PMS patients.



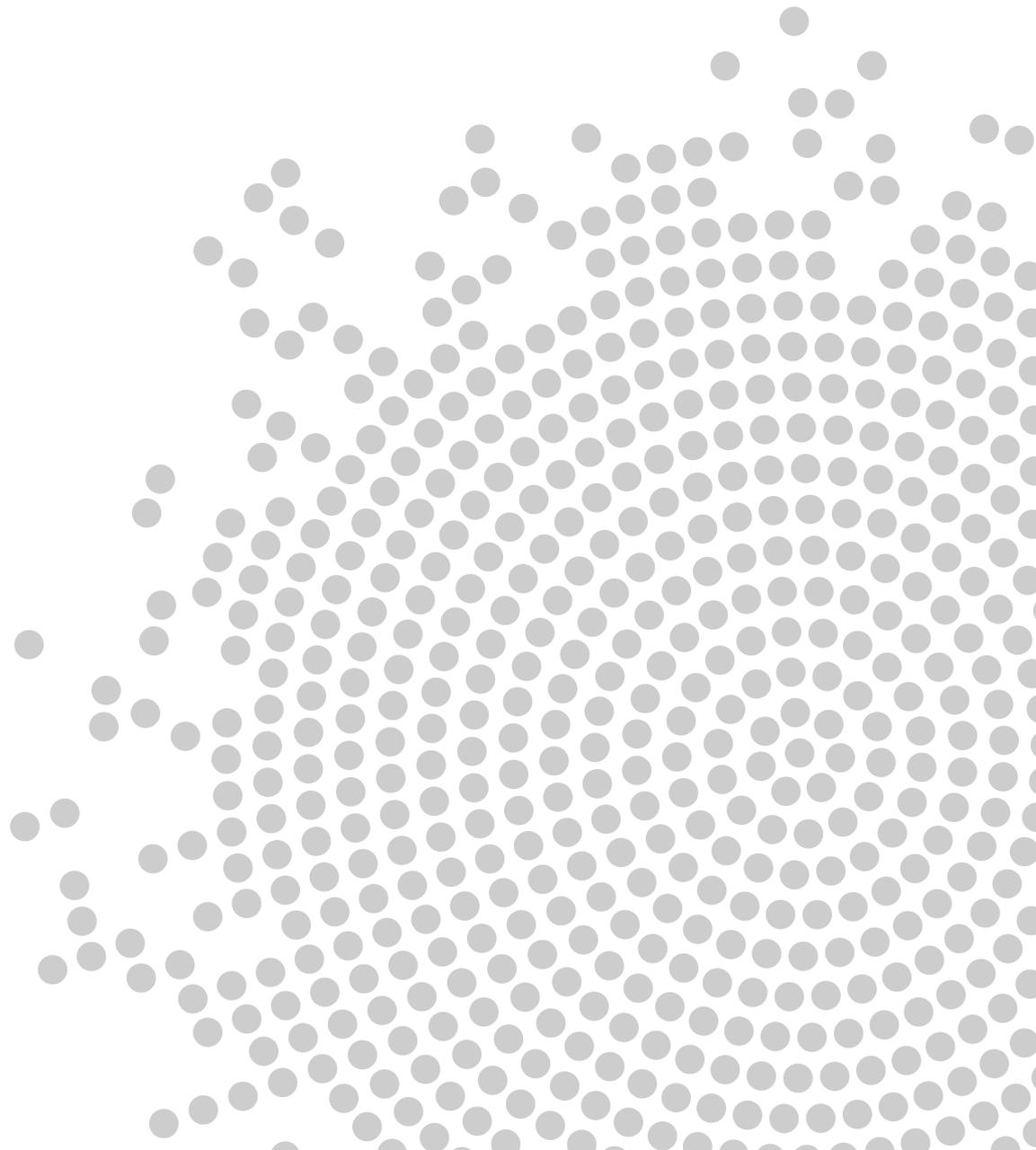
PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- 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;24(1):37-46. doi: 10.1080/14728222.2020.1709823. Epub 2020 Jan 3
- 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 24;21(1). pii: E143. doi: 10.3390/ijms21010143
- 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;131(2):566-573. doi: 10.1016/j.clinph.2019.10.023. Epub 2019 Nov 21
- 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 8;20(24). pii: E6193. doi: 10.3390/ijms20246193
- 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 13;10:2197. doi: 10.3389/fimmu.2019.02197. eCollection 2019. Review
- 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 20;1545968319868713. doi: 10.1177/1545968319868713
- 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 4;1352458519853473. doi: 10.1177/1352458519853473

Progetto speciale FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 84.215,22 €
FISM special project funded in 2019 and the amount of € 84,215.22

SM progressiva

Progressive MS



Linee guida EAN sulle cure palliative per le persone con sclerosi multipla grave



Alessandra Solari

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

TASK FORCE MEMBERS

Andrea Giordano, Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano; Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino, Torino

Jaume Sastre-Garriga, Edwin R. Meza Murillo, Department of Neurology/Neuroimmunology, Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Sascha Köpke, Institute of Clinical Nursing Science, University of Cologne, Cologne; Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Anne C. Rahn, Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Ingo Kleiter, Marianne-Strauß-Klinik, Behandlungszentrum Kempfenhausen für Multiple Sklerose Kranke gGmbH, Berg, Germany

Katina Aleksowska, European Academy of Neurology, Vienna, Austria

Mario A. Battaglia, Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena, Siena

Jette Bay, Multiple Sclerosis International Federation, People with MS Advisory Committee, Copenhagen, Denmark

Massimiliano Copetti, Unità di Biostatistica, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia

Jelena Drulovic, Clinic of Neurology, CCS, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Liesbeth Kooij, John Mens, Nieuw Unicum, Zandvoort, The Netherlands

Ivan Milanov, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria

Ron Milo, Department of Neurology, Barzilai Medical Center, Ashkelon; Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

Tatjana Pekmezovic, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Janine Vosburgh, Israel Multiple Sclerosis Society, Tel-Aviv, Israel

Eli Silber, Department of Neurology, King's College Hospital NHS Foundation Trust, London, UK

Simone Veronese, Fondazione FARO onlus, Torino

Francesco Patti, Clinica Neurologica, Centro Sclerosi Multipla, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania

Raymond Voltz, Department of Palliative Medicine, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

David J. Oliver, The Tizard Centre, University of Kent, Canterbury, UK

Le persone con sclerosi multipla (SM) grave hanno bisogni fisici e psicosociali complessi, spesso per un lungo periodo di tempo. A ciò si aggiungono le ridotte opzioni terapeutiche in grado di prevenire o limitare la progressione clinica in questa popolazione di pazienti.

Data la considerevole disomogeneità delle cure palliative per la SM in Europa, EAN (European Academy of Neurology) ha messo a punto una task force internazionale che ha prodotto un documento di Linee Guida per la pratica clinica dedicato alle cure palliative dei pazienti con SM grave. Altre organizzazioni che hanno patrocinato l'iniziativa sono EAPC (European Association for Palliative Care) e RIMS (European Network For Best Practice and Research in Multiple Sclerosis Rehabilitation). Inoltre, membri della task force sono stati designati da MSIF (Multiple Sclerosis International Federation) e ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis).

Non esiste una definizione univoca di SM grave. In queste Linee Guida, è stato adottato il valore soglia corrispondente alla necessità di assistenza nel camminare per circa 20 metri, vale a dire un punteggio > 6.0 all'EDSS (Expanded Disability Status Scale). Le Linee Guida sono state prodotte impiegando il metodo GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation). I quesiti clinici di interesse sono stati formulati in formato "PICO" (Popolazione, Intervento, Comparatore, Outcome), con il contributo dei pazienti con SM e dei loro familiari, e del personale sanitario dedicato alla malattia. Ove non si è trovata evidenza scientifica, la task force ha prodotto le proprie raccomandazioni sulla scorta di evidenza indiretta, o ha formulato indicazioni di buona pratica clinica.

La task force ha formulato 10 quesiti clinici. Essi comprendono le cure palliative generali e specialistiche, la pianificazione anticipata e condivisa delle cure, la condivisione con il personale sanitario del desiderio del paziente di anticipare la morte, la gestione dei sintomi, la riabilitazione multidisciplinare, gli interventi formativi e di supporto rivolti al familiare del paziente, e quelli formativi rivolti al personale sanitario. Per garantire che i quesiti clinici fossero formulati coinvolgendo tutti i portatori di interesse, sono stati condotti una indagine online e gruppi di discussione con persone con SM e familiari, per un totale di circa mille partecipanti. In risposta ai quesiti clinici, la task force ha prodotto 34 raccomandazioni (33 'deboli' e una 'forte' in base alla classificazione GRADE) e 7

indicazioni di buona pratica clinica. Tutte le raccomandazioni riguardavano 4 quesiti clinici (cure palliative generali e specialistiche, gestione dei sintomi, riabilitazione multidisciplinare). Una metanalisi su dati individuali ha prodotto risultati significativi in favore delle cure palliative domiciliari per dolore (coefficiente di regressione -17.36; IC 95% -31.54 - -3.18) e disturbi del sonno (coefficiente di regressione -14.15; IC 95% -26.93 - -1.36), mentre non è emerso un effetto significativo rispetto al controllo degli altri 5 sintomi considerati, né sulla riduzione del carico del familiare. Il maggior numero degli studi selezionati relativi al controllo dei sintomi (32/44, 73%; 31 trial clinici) riguardava la spasticità. Di questi, 26 trial (84%) erano relativi a farmaci (baclofene, benzodiazepine, cannabinoidi, gabaergici, tizanidina, e tossina botulinica) e 5 a interventi non farmacologici. È stato possibile condurre una meta-analisi su 3 trial clinici relativi al cannabinoide nabiximols.

I dati hanno dimostrato una riduzione significativa della spasticità nei pazienti trattati con nabiximols rispetto ai pazienti trattati con placebo su due misure di esito: la valutazione fornita dal paziente utilizzando una scala numerica (-0.51; IC 95% -0.96 -0.07), e la valutazione globale fornita dal clinico della "facilità di trasferimento" (Odds Ratio 1.99, IC 95% 1.17 - 3.38).

Per i due quesiti clinici relativi a interventi di formazione e sostegno rivolti ai familiari, è stata individuata una sola pubblicazione, mentre non è stata reperita alcuna evidenza scientifica per 4 quesiti clinici: pianificazione anticipata e condivisa delle cure, condivisione con il personale sanitario del desiderio del paziente di anticipare la morte, interventi formativi rivolti al personale sanitario (2 quesiti). Per questi quesiti clinici la task force ha prodotto 6 indicazioni di buona pratica clinica.

Le cure palliative domiciliari sono raccomandate per i pazienti con SM grave (raccomandazione di forza debole). Aree per le quali è necessario produrre evidenza scientifica in questa popolazione di pazienti sono la pianificazione anticipata e condivisa delle cure, la gestione di sintomi quali la fatica e i disturbi dell'umore, gli interventi rivolti ai familiari dei pazienti e quelli destinati agli operatori sanitari. È in corso la disseminazione di queste Linee Guida mediante pubblicazione nelle riviste delle società scientifiche patrocinanti, e presentazione a convegni nazionali e internazionali.

EAN guideline on palliative care of people with severe multiple sclerosis

Patients with severe multiple sclerosis (MS) have complex physical and psychosocial needs, typically over several years. Few treatment options are available to prevent or delay further clinical worsening in this population.

Recognizing significant variation in the palliative care of patients with severe MS across Europe, the European Academy of Neurology (EAN) assembled an international task force that developed an evidence-based clinical practice

guideline for the palliative care of patients with severe MS. Other partnering organizations were the European Association for Palliative Care (EAPC), and the European Network for Best Practice and Research in MS Rehabilitation (RIMS). Task force members were also appointed by the MS International Federation (MSIF) and by the European Committee for Treatment and Research in MS (ECTRIMS).

No uniform definition of severe MS exists: in this guideline, we referred to patients needing assistance to walk about 20 meters, or higher disability (20 meters, or higher disability) (Expanded Disability Status Scale score > 6.0). The guideline was developed using the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) methodology. Formulation of the clinical questions was performed in Patients Intervention Comparator Outcome (PICO) format, involving patients, carers and healthcare professionals (HPs). When evidence was lacking for this population, the guideline task force formulated recommendations using indirect evidence, or devised good practice statements (instead of abstaining from any recommendation).

The task force formulated 10 clinical questions, which encompassed general and specialist palliative care, advance care planning, discussing with HPs the patient's wish to hasten death, symptom management, multidisciplinary rehabilitation, interventions for caregivers, and interventions for HPs. To ensure client involvement, about one thousand MS patients and caregivers were involved via an international online survey and focus group meetings in the formulation of the clinical questions. The task force formulated a total of 34 recommendations (33 weak, 1 strong) and 7 good practice statements in response to the clinical questions. All the recommendations pertained to four clinical questions (general and specialist palliative care, symptoms management, and multidisciplinary rehabilitation). An individual participant metanalysis showed a statistically

significant effect in favor of home-based palliative care on pain (regression coefficient -17.36; 95% CI -31.54 to -3.18) and sleeping problems (regression coefficient -14.15; 95% CI -26.93 to -1.36), while there was no effect on the remaining five symptoms considered, and on caregiver burden. Considering symptoms management, the majority of the included publications (32/44, 73%; 31 trials) addressed spasticity as an outcome. Of these, 26 trials (84%) addressed drugs (baclofen, benzodiazepines, cannabinoids, gabapentin, tizanidine, and botulinum toxin) and 5 trials addressed non-pharmacological treatments. A meta-analysis was performed for nabiximols: all the three RCTs on this cannabinoid shared patient-reported numerical rating scale (NRS) for spasticity, and caregiver global impression of change (GIC) "ease of transfer". Mean NRS spasticity difference favored nabiximols (-0.51; 95% CI -0.96 to -0.07); and the odds ratio (OR) for GIC "ease of transfer" improvement was 1.99 (95% CI 1.17 to 3.38) for nabiximols vs placebo.

Only one study was for the two clinical questions addressing interventions for caregivers. No research evidence was found for four clinical questions: ACP, discuss with HPs the wish to hasten death, and interventions for HPs (two clinical questions). For these clinical questions the task force produced six good practice statements.

The provision of home-based palliative care is recommended with weak strength for patients with severe MS. Further research on the integration of palliative care and MS care is needed. Areas that currently lack evidence of efficacy in this population include advance care planning, the management of symptoms such as fatigue and mood problems, interventions for caregivers and HPs. The guideline is being disseminated via publication in the journals of the partnering societies, and presentation at national and international conferences.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- Köpke S, Giordano A, Veronese S, Rahn A, Kleiter I, Basedow-Rajwicz B, Fornari A, Battaglia MA, Drulovic J, Kooij L, Koops J, Mens J, Meza Murillo ER, Milanov I, Milo R, Patti F, Pekmezovic T, Sastre-Garriga J, Vosburgh J, Voltz R, Bay J, Oliver DJ, Solari A. Patient and caregiver involvement in the formulation of guideline questions: findings from the European Academy of Neurology guideline on palliative care of people with severe multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2019; 26(1): 41-50.
- Solari A, Veronese S, Oliver DJ. Reader response: Inpatients with neurologic disease referred for palliative care consultation. *Neurology - Disputes & Debates: Rapid online correspondence*. Published July 09, 2019. <https://n.neurology.org/content/92/17/e1975>.
- Solari A, Giordano A, Köpke S, Patti F, Drulovic J, Sastre-Garriga J, Kleiter I, Rahn AC, Silber E, Milo R, Vosburgh J, Mens J, Milanov I, Pekmezovic T, Meza-Murillo ER, Copetti M, Aleksovskaja K, Bay J, Battaglia MA, Voltz R, Veronese S, Oliver DJ. European Academy of Neurology guideline on palliative care of people with severe multiple sclerosis. *Mult Scler* 2019; 25: (S2) 891.
- Solari A, Pucci E. There is an urgent need for palliative care specialists in MS - Yes. *Mult Scler* 2019; 25: 1710-1711.

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 67.160 €
FISM Special Project funded in 2017 and the amount of € 67,160

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



Maria Pia Abbraccio e Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Marta Fumagalli, Davide Lecca, Davide Marangon, Chiara Parravicini

I farmaci immunomodulatori sono efficaci nella terapia della sclerosi multipla recidivante-remittente ma non sono attivi nelle forme progressive della malattia, per la quale non è attualmente disponibile alcuna cura. Per le forme progressive sono in via di sviluppo strategie mirate alla riparazione del danno e alla ri-mielinizzazione. Nostri studi precedenti hanno riconosciuto il recettore di membrana GPR17, un attore cruciale nella transizione dei precursori oligodendrogliali a cellule mature mielinizzanti, come un bersaglio con un potenziale riparativo da perseguire per la cura delle forme progressive. Obiettivo di questo progetto è lo sviluppo di un brevetto dedicato a tre nuove famiglie chimiche di composti in grado di attivare GPR17 e di indurre mielinizzazione dei precursori oligodendrogliali.

I dati sperimentali prodotti ci hanno permesso di ottenere la concessione di questo brevetto in Italia, Giappone, Cina e USA, Unione Europea, Israele e Corea. Alcuni dei composti selezionati si sono mostrati molto attivi, sia attivando GPR17 umano in saggi in colture cellulari sia inducendo mielinizzazione in un modello di colture miste di precursori oligodendrogliali e neuroni. Una molecola estremamente selettiva (nome di fantasia: Galinex) per GPR17, scelta come prototipo sulla base di studi farmacocinetici *in silico* e *in vivo*, ha ritardato significativamente l'insorgenza della malattia nel modello sperimentale di riferimento per la sclerosi multipla (encefalomielite autoimmune sperimentale). In questo stesso modello, stiamo inoltre valutando l'eventuale effetto sinergico di galinex, caratterizzato da attività protettiva della mielina, con fingolimod, farmaco immunomodulante di riferimento già in uso per il trattamento della sclerosi multipla.

In parallelo, abbiamo riconsiderato un database di composti molto numeroso (approssimativamente un milione di sostanze) generato negli anni precedenti sempre nell'ambito del progetto che ha dato origine a galinex,

con lo scopo di sviluppare nuove molecole caratterizzate da originalità chimica, attraverso un'analisi di clustering e prioritizzazione chemoinformatica al computer. Prima di procedere con la sintesi chimica, abbiamo predetto il loro profilo farmacocinetico e la potenziale attività a livello del sistema nervoso centrale attraverso metodi di farmacocinetica computazionale. Le molecole più promettenti tra quelle selezionate, sono state sintetizzate e valutate nei saggi di riferimento su colture cellulari, nei quali si sono dimostrate molto attive sul recettore di nostro interesse, GPR17. Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo sviluppato un modello al computer di relazione quantitativa struttura-attività in grado di valutare molto velocemente l'attività di numerose altre molecole su GPR17, basandosi sull'analisi della struttura chimica. Per cercare di identificare quali delle molecole attive potranno essere portate avanti nello sviluppo, abbiamo applicato il metodo computazionale innovativo, SPILLO-PBSS, che è servito a stimare quale delle molecole valutate avesse meno probabilità di interagire con altri bersagli, oltre che con GPR17, cercando con questo di ridurre al minimo quelli che si definiscono effetti off-target e quindi potenzialmente tossici, collaterali o inattesi. Questo metodo ci ha suggerito particolari decorazioni chimiche, la cui presenza sembra in grado di rendere le molecole molto selettive per GPR17. La dimostrazione dell'attività delle molecole di sintesi più promettenti nel modello animale di encefalomielite autoimmune sperimentale (ed eventualmente anche in altri modelli di mielinizzazione) fornirà a UniMI/FISM un portfolio che includa brevetti di sintesi ed uso. Al fine di valorizzare tale portfolio e trasferirlo in un ambito di ricerca più avanzato e clinico, nelle varie fasi di sviluppo del pacchetto preclinico, FISM - con il supporto dei ricercatori di UniMI - si sta occupando di contattare potenziali stakeholder e di coordinare un'attività di negoziazione del

brevetto d'uso con venture capital dedicati proprio allo sviluppo di farmaci ri-mielinizzanti nella sclerosi multipla. Inoltre, un'analisi di anteriorità brevettuale della nostra

chemoteca ha permesso di identificare alcune molecole già descritte in letteratura come coinvolte nella modulazione di meccanismi molecolari in altre patologie.

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

Immunomodulating drugs are effective in the therapy of relapsing-remitting multiple sclerosis but not in the progressive forms of the disease, for which no treatment is presently available. Strategies aiming at damage repair and at re-myelination are currently being developed to address new therapies for the progressive forms. Our earlier studies recognized membrane receptor GRP17, a crucial player in the transition from oligodendroglial precursors to mature myelin-producing cells, as a target with a reparative potential on which to focus for the treatment of progressive forms. The goal of this project is the deployment of a patent devoted to three novel chemical families of molecules able to activate GPR17 and to induce myelination of the oligodendroglial precursor.

The experimental data produced so far have led to the granting of a patent, awarded in Italy, Japan, China, USA, European Union, Israel and Korea. Some of the selected compounds appear very effective, both activating human GPR17 in cell culture assays and inducing myelination in mixed cultures of oligodendroglial precursors and neurons. 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).

In this model, we are currently evaluating a possible synergistic effect between galinex and the reference immunomodulatory drug fingolimod already in use for the treatment of multiple sclerosis.

In parallel to the above, 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. The 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 results we had obtained, we developed a quantitative structure-activity relationship model able to assess very rapidly the activity on GPR17 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 evaluating 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. This approach suggested us specific chemical decorations whose presence seems to sharpen the affinity of the molecules for GPR17.

The demonstration of activity for the most promising molecules of original synthesis on the animal model of experimental immune encephalomyelitis (and possibly on other models of myelination) will provide UniMI/FISM with a portfolio that includes patents of synthesis and use. In order to add value to such portfolio and to transfer it to a more advanced, clinically oriented environment through the different steps of its development, FISM – with the support of scientists at UniMI – is contacting potential stakeholders and coordinating negotiation with venture capitals devoted to the development of re-myelinating drugs for multiple sclerosis.

In addition, the analysis of patent priority on our chemical databases allowed the identification of some molecules already described to be involved in the modulation of different molecular mechanisms in other pathologies.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- Lecca D, Raffaele S, Abbracchio MP, Fumagalli M. Regulation and signaling of the GPR17 receptor in oligodendroglial cells. *Glia*. 2020 Feb 22. doi: 10.1002/glia.23807. [Epub ahead of print] Review
- 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. Epub 2018 Feb 9.
- 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. Epub 2016 Aug 20

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 365.830 €
 FISM Special Project funded in 2013 and the amount of € 365,830

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



Antonio Bertolotto

Neurologia & CRESM; Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

Fabiana Marnetto, Federica Brescia, Paola Valentino, Antonella Ficorilli

Nonostante i considerevoli investimenti nella ricerca clinica, sono pochi i risultati di laboratorio che si traducono nello sviluppo di nuovi farmaci: questo è dovuto spesso alla scarsa riproducibilità dei dati pubblicati (per mancanza di rigore nella raccolta dei campioni biologici), alla mancanza di validazione dei metodi utilizzati e alla limitata condivisione dei risultati. La disponibilità di campioni biologici raccolti e conservati secondo standard di qualità riveste oggi un ruolo cruciale nel campo della ricerca biomedica, sia di base sia traslazionale, volta alla comprensione dei meccanismi patogenetici, dei fattori prognostici/predittivi, o all'identificazione di biomarcatori diagnostici, prognostici e di risposta ai trattamenti.

In questo contesto nel 2013 è nata l'idea di creare la Biobanca del CRESM (BB-CRESM), una biobanca al servizio della ricerca sulla SM, a partire dalla collezione storica di campioni biologici e dati del Laboratorio di Neurobiologia Clinica del CRESM.

L'obiettivo principale da raggiungere con il supporto del Finanziamento 2018/S/04 era il riconoscimento istituzionale della Biobanca da parte della AOU San Luigi Gonzaga di Orbassano, finalizzato alla pubblicazione del Regolamento della Biobanca, del Manuale delle Procedure Operative Standard (SOP) e dell'accordo per il trasferimento di campioni e dati (MTDA).

Riconoscimento istituzionale della Biobanca

Il riconoscimento istituzionale rappresenta il primo step indispensabile per l'attivazione di una biobanca di ricerca clinica che, per essere considerata tale, deve essere riconosciuta dalle autorità sanitarie competenti. In Italia l'ente che supporta l'istituzione e la gestione delle biobanche

di ricerca è l'Infrastruttura Nazionale dei Centri di Risorse Biologiche e delle Biobanche (BBMRI). In seguito a un "Audit" da parte di BBMRI, che ha dato esito positivo, nel 2018 la BB-CRESM è entrata a far parte del nodo italiano di BBMRI.

L'iter per il riconoscimento istituzionale della Biobanca ha visto il personale della BB-CRESM impegnato su diversi fronti (giuridico, etico, clinico, biologico, di gestione della qualità), per la stesura dei documenti ufficiali della Biobanca. Il documento fondamentale per l'istituzione della Biobanca è il Regolamento o Statuto, che descrive le finalità della Biobanca, la struttura e la gestione da parte degli organi che la dirigono (Comitato Scientifico, Direttore, personale), le modalità di richiesta e di trasferimento dei campioni biologici e dei dati associati, le modalità di mantenimento della Biobanca. Un altro elemento fondamentale è il Manuale delle SOP, nell'ambito della gestione qualità della Biobanca, dove sono descritte tutte le procedure di raccolta, processamento, stoccaggio e trasferimento dei campioni biologici e dei dati ad essi associati. È stato redatto il modello per il trasferimento di campioni e dati ai ricercatori richiedenti (MTDA), che è fondamentale per garantire il corretto utilizzo dei materiali biologici e dei dati trasferiti. L'informativa per i soggetti che partecipano alla Biobanca e il modulo di consenso informato già esistenti sono stati implementati e aggiornati in accordo con il Regolamento Europeo sulla protezione dei dati (GDPR). Inoltre, è stata effettuata una valutazione di impatto della Biobanca sulla privacy (PIA), al fine di tutelare la riservatezza delle persone che donano campioni biologici e dati alla Biobanca.

Valutazione dell'impatto dei fattori preanalitici sulla qualità dei campioni di sangue raccolti per studi di espressione genica

La BB-CRESM raccoglie campioni sangue destinati all'estrazione di RNA per studi di espressione genica. Nell'ambito del progetto finanziato da FISM è stato condotto uno studio che ha dimostrato come il tempo e la temperatura di conservazione delle provette di sangue dal momento del prelievo al momento del congelamento del RNA possano alterare in modo significativo l'espressione di alcuni geni. Grazie a questo studio è stato possibile stabilire procedure standardizzate da applicare nel contesto della Biobanca (e da condividere con altri ricercatori), al fine di ridurre l'impatto di tempo e temperatura sull'espressione di determinati geni, quando non sia possibile l'utilizzo di provette da prelievo specifiche contenenti uno stabilizzante per l'RNA.

Quantificazione del livello di sNFL

I neurofilamenti sierici (sNFL) rappresentano oggi uno dei marcatori più promettenti per misurare il danno neuronale nella SM e in altre patologie neurologiche. Grazie anche al supporto di FISM, il Laboratorio di Neurobiologia Clinica del CRESM è dotato della strumentazione necessaria per testare i sNFL mediante la tecnologia ultrasensibile SIMOA e può dosare questo biomarcatore nei campioni

conservati nella Biobanca. La disponibilità di questo ulteriore dato biologico non può che aumentare la qualità dei campioni che la Biobanca potrà fornire ai ricercatori richiedenti.

Numeri della BB-CRESM

Ad oggi la BB-CRESM mette a disposizione dei ricercatori per l'effettuazione di studi nell'ambito della SM e di altre patologie neurologiche e autoimmuni i seguenti campioni biologici e dati associati: 3.000 campioni di sangue (siero, plasma, DNA, RNA) e 500 campioni di liquor alla diagnosi da 1.000 soggetti; 20mila campioni di siero da 900 pazienti con SM che a partire dal 2002 sono stati collezionati dal Laboratorio del CRESM come residui di campioni di diagnostica.

Grazie al supporto di FISM, la BB-CRESM rappresenta oggi la prima biobanca italiana al servizio della ricerca sulla SM, finalizzata alla raccolta, conservazione e distribuzione di campioni biologici umani e dei dati personali ad essi associati, secondo criteri di qualità, di organizzazione e destinazione, condivisi a livello nazionale e internazionale, all'interno dell'infrastruttura europea BBMRI. La BB-CRESM contribuisce allo svolgimento di studi di ricerca di qualità sulla SM, fondati su campioni e dati raccolti in modo strutturato e standardizzato, favorendo lo scambio dei dati e la riproducibilità dei risultati ottenuti.

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

Despite considerable investment in clinical research, very few laboratory results are transformed into drugs. Indeed, the research field suffers from poor reproducibility of data, even those published in prestigious journals, because of lack of rigor in the collection of biological samples, insufficient validation of the methods and limited sharing of data.

The availability of biological samples collected and stored following strict quality standards represents a crucial tool in the field of biomedical and translational research, in order to better understand disease pathogenesis, to identify biomarkers of diagnosis, prognosis and treatment response. In this context, the idea of the CRESM Biobank (BB-CRESM), a biobank fully devoted to research in MS, raised in 2013, starting from the collection of biological samples of the Clinical Neurobiology Laboratory of CRESM, and it was funded by FISM.

All samples and data stored in the BB-CRESM can be distributed to several research centers, universities, public or private institutions that may require them to perform research studies in the field of MS or other neurological or autoimmune diseases.

The main focus of the Biobank Project 2018/S/04 was the Institutional commitment within the San Luigi Gonzaga Hospital, in order to create an official Biobank Regulation, Standard Operative Procedures (SOP) Manual, Material and Data Transfer Agreement document (MDTA).

The Institutional Commitment of the BB-CRESM

The main focus of the Biobank Project 2018 was the formal recognition of the BB-CRESM within the San Luigi Gonzaga Hospital, which also required to ensure that samples and data collections were developed within appropriate legal, ethical, clinical, scientific, and technical

guidelines. BBMRI (Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure of Italy) is the Italian node of a larger European consortium that aims to support biobanks in their creation, generation, institution, diffusion, management and ethical issues. Following a successful "Audit", the BB-CRESM joined the Italian node of BBMRI in 2018.

The main document needed for the institutional commitment of the biobank was the BB-CRESM Regulation. The document explains the aims, the activities and the structure of the BB-CRESM (the Scientific Committee, the Director, other personnel involved, and their role in the biobank). The ways of collection and distribution of samples and data between the biobank and the researchers are also described in this document.

The Manual of Standard Operating Procedures (SOPs) of the BB-CRESM is another important document created for the institutional commitment and focuses on the quality management of the Biobank. The manual collects all procedures: collection, processing, storage and transferring of samples and associated data. To the matter, a specific Material and Data Transfer Agreement (MTDA) was drafted in order to guarantee the right usage of samples and transferred data by the researchers requesting them. The already existing policy for those patients and healthy subjects participating to the Biobank and the informed consent module were furthermore implemented and updated, following the European Regulation for Data Protection (GDPR). Moreover, a Biobank privacy impact assessment (PIA) has been performed, in order to protect the confidentiality of people who participate with their biological samples and data to the Biobank.

Evaluation of the Pre-Analytic Impact on Sample Quality in the context of gene expression studies

BB-CRESM collects blood samples for RNA extraction for gene expression studies. Within the project funded by FISM, we performed a specific study that showed how time and storage temperature of collected blood test tubes, from the blood draw to the freezing, can se-

verely impact on the expression of some genes. Thanks to this study, standardized procedures about pre-analytic handling of blood samples have been established for the BB-CRESM in order to reduce the impact of time and temperature on the expression levels of mRNA of several genes, when no specific test tubes with RNA stabilizing agents are available. Such procedures can be shared with other researchers in order to minimize the impact of pre-analytical factors on gene expression studies.

Quantification of sNFL levels

Nowadays, serum neurofilaments (sNFL) represents one of the most promising biomarkers to measure neuronal damage in SM and other neurological pathologies. The Clinical Neurobiology Laboratory of CRESM is now equipped to test sNFL using the ultrasensitive SIMOA technology. Thus, the biomarker dosage can currently be performed on samples stored in the Biobank. The availability of this additional data can only increase the quality of the samples the Biobank has to offer to requiring researchers.

BB-CRESM numbers

Today, BB-CRESM provides researchers with numerous samples and associated data to perform studies in the field of MS and other neurological and autoimmune pathologies: 3,000 blood samples (serum, plasma, DNA and RNA) and 500 diagnostic liquor samples from 1,000 subjects; 20,000 serum samples from 900 MS patients, previously collected by CRESM Laboratory as diagnostics' remnants since 2002.

Thanks to FISM support, BB-CRESM is now the first Italian biobank focused on MS research and aimed to collect, store and distribute human biological samples and associated personal data following criteria of quality, organization and destination, shared at an international level among the European BBMRI infrastructure. BB-CRESM thus contributes to many and important SM research studies, based on samples and data collected in a structured and standardized manner, favoring data sharing and results reproducibility.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Publications

- Andrea Marcinnò, Fabiana Marnetto, Paola Valentino, Serena Martire, Alessia Balbo, Aurora Drago, Maria Leto, Marco Capobianco, Giancarlo Panzica, and Antonio Bertolotto: "Rituximab-induced hypogammaglobulinemia in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders". *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2018;5:e498. doi:10.1212/NXI.0000000000000498*
- Montarolo Francesca, Perga Simona, Martire Serena, Brescia Federica, Caldano Marzia, Lo Re Marianna, Panzica Giancarlo, Bertolotto Antonio. "A study of the NR4A family gene expression in Multiple Sclerosis patients treated with Fingolimod". *European Journal of Neurology*, 2019 Apr;26(4):667-672. doi: 10.1111/ene.13875. Epub 2018 Dec 22

Conference abstracts and invited lectureships

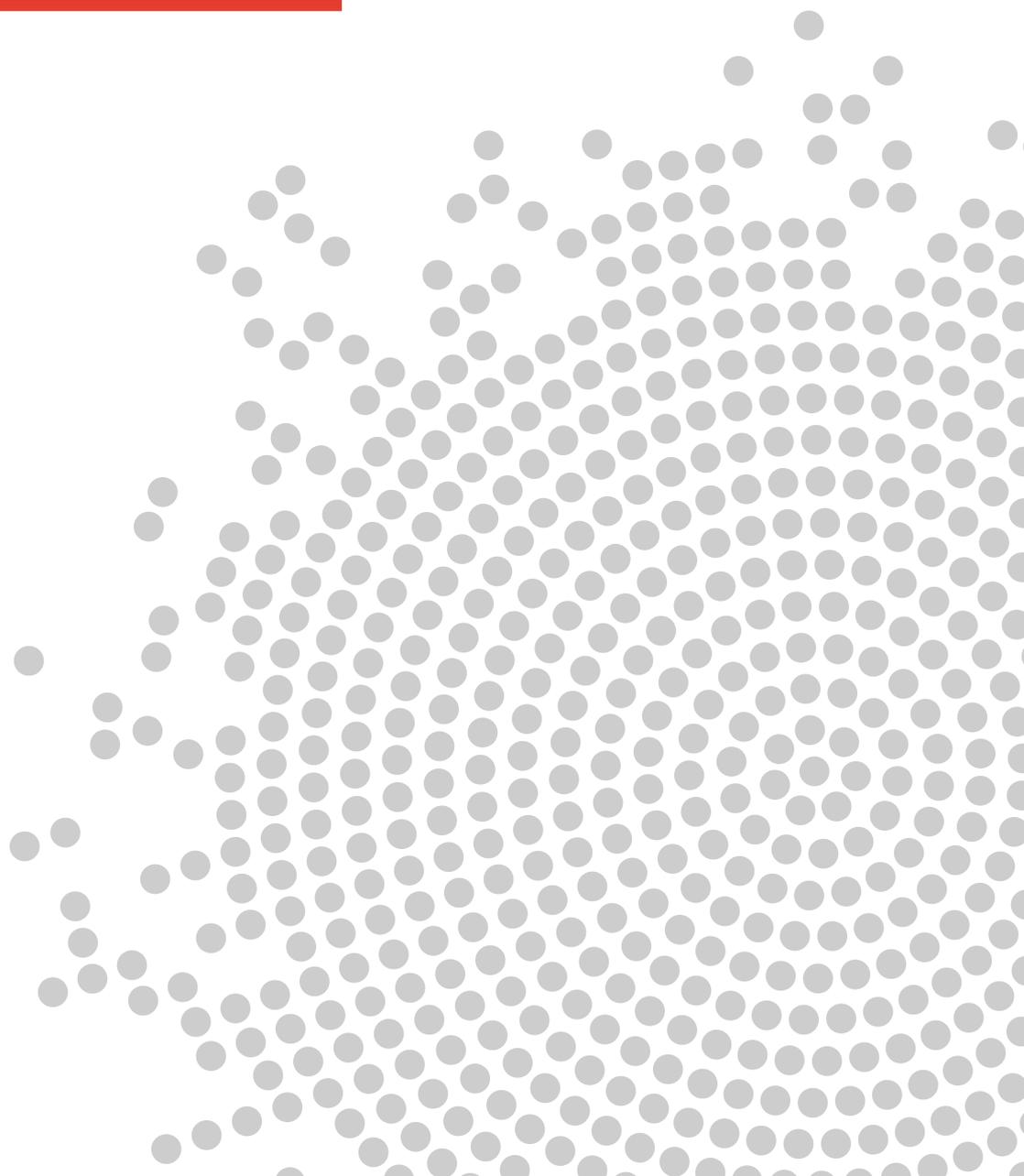
- Valentino P, Marnetto F, Caldano M, Bertolo J, Martire S, Bertolotto A: "Quality controls in biobank samples: effects of pre-analytical factors on blood samples used in gene expression studies". Poster Presentation at the 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Berlin (De), October 10th-12th 2018

- Fabiana Marnetto, Paola Valentino, Jessica Bertolo, Giulia Siravegna, Benedetta Mussolin, Serena Martire, Antonio Bertolotto. "Development of a high sensitive molecular assay to improve individualized monitoring of Rituximab treatment in patients with NMOSD". Oral presentation at XXVIII AINICongress, Camogli (GE), May 6th-9th, 2019
- Fabiana Marnetto. "ddPCR approach for molecular monitoring of Rituximab therapy in patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders". Droplet Digital PCR scientific conference, Bio Rad, Milano, June 5th, 2019
- Fabiana Marnetto, Paola Valentino, Federica Brescia, Serena Martire, Marzia Caldano, Antonio Bertolotto. Quality control methods in biobanking: Pre-Analytic Impact on Sample Quality in the context of gene expression studies. Poster presentation at the European Biobank Week, Lubeck (De), October 8th-11th, 2019

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2018 e l'ammontare di 100.000 €
FISM Special Project funded in 2018 and the amount of € 100,000

Verso nuovi trattamenti

Towards
new treatments



Uso della genetica per identificare bersagli terapeutici e selezionare composti in grado di modularli nella sclerosi multipla



Francesco Cucca

*Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, Sassari
Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Monserrato CA*

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, Centro Regionale per la cura della SM, Cagliari*
Rachael Bashford-Rogers, *University of Oxford, UK*
Kylie James, *Sanger Center, Cambridge, UK*
Nicola Segata, *Centro di Metagenomica Computazionale, Università degli Studi di Trento, Trento*

I meccanismi molecolari coinvolti nel processo patogenetico della sclerosi multipla (SM) sono ancora poco chiari e in parte sconosciuti. Questo progetto propone di elucidarli studiando il coinvolgimento dell'immunità associata all'intestino (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT). Esso rappresenta il sito di produzione di cellule autoreattive che, mediante il circolo ematico, possono raggiungere il sistema nervoso centrale provocando i danni responsabili dell'insorgenza e della progressione della SM. Il progetto si basa su nostri risultati preliminari che suggeriscono il coinvolgimento di specifiche cellule GALT (cellule PB-GALT), e di geni che controllano i loro livelli nel sangue periferico nella patogenesi della SM. Per chiarire le specifiche cellule implicate, il progetto prevede un'attività di tre anni. Nei primi semestri è stato previsto di attuare una caratterizzazione dettagliata dei sottotipi di cellule GALT mediante la citofluorimetria policromatica, quantificare sul siero un ampio spettro di molecole rare in individui della popolazione generale (coorte ProgeNIA), già profondamente caratterizzati geneticamente, ed estendere le raccolte esistenti di DNA caso-controllo da tutta la Sardegna e caratterizzarle geneticamente in maniera estensiva. Analisi statistiche identificheranno sia varianti genetiche che controllano i livelli ematici delle cellule GALT e dei fattori solubili quantificati che nuovi loci di sovrapposizione genetica con la SM. Sono stati previsti esperimenti per: i) stabilire attraverso il sequenziamento dell'RNA i profili di

espressione genica e la loro regolazione genetica (eQTL) nei tipi cellulari maggiormente correlati alla SM, ii) valutare se le specie batteriche intestinali sono differenzialmente rappresentate in individui con elevati livelli di cellule GALT e con genotipi di predisposizione alla SM rispetto a individui con bassi livelli di cellule GALT e con genotipi di protezione alla SM, iii) sequenziare contemporaneamente, in pazienti con SM alla diagnosi, il repertorio dei recettori dei linfociti B (BCR) e l'intero trascrittoma a livello di singole cellule nel Liquor Cefalorachidiano (CSF, *liquor*) e parallelamente sequenziare il profilo del BCR tramite un approccio mirato ("targeted sequencing") nel sangue periferico. Questo ci permetterà di verificare direttamente lo scambio di cloni di cellule GALT B tra il sangue periferico e il *liquor* e di stabilire se in quest'ultimo esista un arricchimento di cloni di linfociti B provenienti dal GALT, a supporto del coinvolgimento di queste cellule nell'autoreattività alla base della SM. Il profilo dell'intero trascrittoma delle singole cellule nel CSF ci permetterà di identificare i marcatori specifici delle cellule con un ruolo primario nell'insorgenza della patologia. Le cellule e i marcatori identificati nel progetto, costituiranno i bersagli terapeutici specifici per composti in grado di modularli e contemporaneamente ci permetteranno di sviluppare saggi cellulari per valutarne l'efficacia. Durante il primo anno di ricerca abbiamo focalizzato l'attività di ricerca alle analisi citofluorimetriche dei sottotipi cellulari dell'immunità mucosale, estendendo la quantifi-

cazione del profilo immunologico in 600 individui per le cellule B e per le T helper follicolari (TFh), per un totale di 2.600 individui estensivamente profilati geneticamente e caratterizzati per circa 3.000 tratti immunologici dell'immunità adattativa. I tratti immunologici includono i tipi cellulari espressi sia come numero di cellule per microlitro che riferiti alle popolazioni parentali da cui essi derivano e includono anche la quantità di ciascun marcatore di superficie per cellula. La caratterizzazione immunologica in ulteriori 600 individui è ancora in corso. Sono inoltre in corso analisi qualitative e di normalizzazione dei tratti misurati durante l'anno rispetto ai dati precedentemente acquisiti, per garantire la necessaria robustezza dei risultati statistici. Successivamente e per ciascun tratto verrà calcolata la stima dell'ereditabilità e la rilevazione delle varianti genetiche che ne influenzano la variabilità. Inoltre, coerentemente agli obiettivi del progetto, durante l'anno abbiamo esteso la raccolta della coorte caso-controllo (tutt'ora in corso), raggiungendo 4.000 SM e 5.000 controlli la cui profilazione genomica è in fase di avvio mediante il chip di genotipizzazione *Illumina Global Screening Array* (GSA) che include circa 710.000 varianti distribuite lungo l'intero il genoma, selezionate per ottimizzare la predizione dei genotipi di varianti genetiche non direttamente caratterizzate (imputazione) e includendo varianti di interesse medico. La personalizzazione

dell'array ci permetterà di caratterizzare ulteriori 30.000 varianti codificanti, rilevate nelle sequenze di 3.514 individui sardi che non sarebbero state statisticamente imputate con sufficiente accuratezza.

È in corso, con altri fondi, l'estrazione di DNA batterico di campioni fecali in individui della coorte da ProgeNIA, che, nell'arco del prossimo anno, verranno sequenziati e analizzati statisticamente rispetto ai livelli di cellule e genotipi predisponenti e protettivi nella SM.

In maniera anticipata rispetto alle previsioni, sono in corso analisi di tipo funzionale (quali CRISPR-Cas9, saggi di luciferasi, RT-PCR, *western blotting*) su loci SM che dai risultati preliminari, sono risultati associati a diminuzione e/o aumento del livello di espressione della proteina di geni in cis e/o in trans. Questi loci sono stati individuati come potenziali candidati bersagli azionabili farmacologicamente. Concludendo, data la qualità dei dati sui tratti cellulari misurati e i risultati delle analisi preliminari su un campione limitato di studio, possiamo prevedere che otterremo molteplici decine di associazioni genetiche con i tratti che includeranno delle varianti genetiche associate anche all'insorgenza della SM. Questo è un risultato a breve termine al quale seguiranno risultati a lungo termine che sfoceranno nello studio di nuovi farmaci diretti contro bersagli selezionati sugli effettivi meccanismi biologici e patogenetici della malattia.

Genetic-driven druggable target identification and selection of modulating compounds in multiple sclerosis

The molecular mechanisms involved in the etiopathogenesis of multiple sclerosis (MS) are still unclear and largely unknown. This project aims to elucidate them with a focus on the role of gut-associated lymphoid tissue (GALT). In our hypothesis this is anatomical site where the production of self-reactive cells occurs. Their subsequent spread through the bloodstream, allow them to reach the central nervous system causing MS onset and her progression. The project was based on our preliminary results that suggest the involvement in the MS pathogenesis of specific GALT cells and genes influencing their levels in peripheral blood (PB-GALT cells). To clarify the specific cells involved, the project foresees a three-year activity. In the first year of the project, the detailed characterization of GALT cell subtypes by polychromatic cytofluorimetry was carried out in parallel to the quantification on serum of a wide spectrum of rare molecules. This was performed

in individuals of the ProgeNIA general population (already deeply characterized genetically). Furthermore, during the same period, the case-control DNA collection and genetic characterization was expanded to samples from all over Sardinia. Statistical analyses will identify both genetic variants that control the blood levels of GALT cells and soluble factors and new loci of genetic overlap with MS. Subsequently, experiments and analyses are planned to: i) establish through RNA sequencing the gene expression profiles and their genetic regulation (eQTL) in the cell types most related to MS, ii) assess whether intestinal bacterial species are differently represented in individuals with high levels of GALT cells and genotypes of MS predisposition compared to individuals with low levels of GALT cells and genotypes of protection to MS, iii) simultaneously sequence, in MS patients at diagnosis, the B lymphocyte receptor repertoire (BCR) and the entire transcriptome at

the level of individual cells in the CSF (Liquor Cephalorachidian) and in parallel the peripheral BCR profile by targeted sequencing: this will allow us to directly verify the exchange of GALT B cell clones between peripheral blood and CSF and to determine whether there is an enrichment of B lymphocyte clones from GALT in the CSF to support the involvement of these cells in the self-reactivity underlying MS. The profile of the entire transcriptome of the single cells in the CSF will allow us to identify the specific markers of the cells that have a primary role in the onset of the disease. The cells and markers identified through the combination of these tasks, will constitute the specific therapeutic targets for compounds able to modulate them and, at the same time, will allow us to develop cellular assays to evaluate their effectiveness.

During the first year we have focused the research activity on cytofluorimetric analyses of mucosal immunity cell subtypes, extending the immunological profile of B and follicular T helper (TFh) cells on 600 individuals, for a total of 2,600 individuals extensively genetically profiled and characterized for about 3,000 immunological traits of adaptive immunity. Immunological traits include cell types calculated as actual counts (cells number for microliter), relative counts with respect to their parental populations and the expression of each surface marker defining the cell types. Immunological profiling in a further 600 individuals is still ongoing. Qualitative and normalization analyses of traits measured during the year are also underway compared to previously acquired data, to ensure the necessary robustness of statistical results. The estimation of heritability and the search of genetic variants affecting their variability will be performed for each trait.

Moreover, in line with the project objectives, during the

first year we have extended the cases-controls collection (still in progress), reaching 4,000 MS and 5,000 control. The genomic profiling is being performed through the Illumina Global Screening Array (GSA) genotyping chip which includes about 710,000 variants distributed throughout the genome, selected to optimize the genotypes prediction of the variants (imputation) not directly characterized and including clinical variants. The customization of the array will allow us to characterize a further 30,000 encoding variants, detected in the 3,514 Sardinian individuals sequences, that would not have been statistically imputed with sufficient accuracy.

Bacterial DNA extraction of faecal samples in ProgeNia cohort is underway, using other funds, and over the next year DNA will be sequenced. Bacterial subtypes will be statistically analyzed on respect to the predisposing and protective MS cell levels and MS genotypes.

In advance of predictions, functional analyses (such as CRISPR-Cas9, luciferase assays, RT-PCR, Western blotting) are underway on MS loci which, according to preliminary results, were associated with a decrease and/or increase in the protein expression level in cis and/or trans genes. These loci were identified as potential target for pharmacological intervention.

Concluding, given the quality of measured cell traits and the preliminary results on a limited sample study, we can predict that we will obtain multiple genetic associations with various traits that overlap with the MS predisposing genetic variants. This is a short-term result that will be followed by long-term results achieved through the study of selected new drugs targets toward the actual biological mechanisms underlying the disease onset.

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



Gianvito Martino

Unità di Neuroimmunologia, INSPE, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Giancarlo Comi, Massimo Filippi, Mara Rocca, Fabio Ciceri, Raffaella Greco, Andrea Falini, Letizia Leocani, Vittorio Martinelli, Lucia Moiola, Francesca Sangalli, Maria Pia Sormani, Camilla Ferri, Giovanna Bombelli, Elena Brambilla, Daniela Capiluppo, Elena Cavone, Marco Bonopane, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Giuseppe Gaipa, Laboratorio di Terapie Cellulari e Geniche Stefano Verri, Monza

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale che porta a un danno della mielina e a perdita assonale. Esistono diverse forme di malattia. In circa l'80% dei pazienti la SM si presenta con ricadute e remissioni, e in 2/3 di essi, dopo 10-15 anni dall'esordio, la SM evolve con un lento ma progressivo accumulo di disabilità (SM secondariamente progressiva). Nel 20% dei casi, la SM presenta invece un decorso primariamente progressivo fin dall'esordio. Per le forme a ricadute e remissioni esistono trattamenti con diversa efficacia, mentre per le forme progressive si somministrano perlopiù terapie sintomatiche. Il razionale per l'utilizzo di cellule staminali neurali fetali umane eterologhe (hNPCs) nella SM, risiede: 1) nella capacità di queste cellule di migrare in aree del sistema nervoso centrale interessate dal processo patologico, promuovendo meccanismi di neuro-riparazione e neuro-protezione mediante l'interazione con astrociti e microglia; 2) nel rilascio di molecole solubili che stimolano l'azione immunomodulante e riparatrice delle cellule staminali neurali endogene auto-rigeneranti e multi-potenti che migrano in aree danneggiate per promuovere neurogenesi e gliogenesi. STEMS è uno studio clinico di fase I consistente in un'unica somministrazione intratecale (rachicentesi), di hNPCs in pazienti adulti con SM progressiva (SMP). L'obiettivo dello studio è valutare fattibilità, sicurezza e tollerabilità delle hNPCs, in prospettiva di sviluppare un trattamento terapeutico.

IL PROTOCOLLO CLINICO STEMS

Il protocollo STEMS consiste in 4 coorti di trattamento di 3 pazienti ciascuna, ognuno dei quali ha ricevuto una singola dose crescente di hNPCs. La sperimentazione cli-

nica proposta è stata progettata per valutare la sicurezza di un'Advanced Therapy Investigational Medicinal e delle procedure applicate. Il potenziale rischio associato all'uso di una nuova tecnologia, alla procedura e al regime d'immunosoppressione, è ben bilanciato dal potenziale beneficio di una terapia innovativa per pazienti ai quali non possono essere offerte altre opzioni terapeutiche. 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 (Tacrolimus) per prevenire il rigetto delle hNPCs, come previsto in caso di trapianti eterologhi. Prima dell'infusione, il paziente è stato rivalutato, trattato con prednisone e, in assenza di controindicazioni, è stata eseguita l'infusione lenta delle hNPCs in regime ospedaliero. Il paziente è stato ampiamente valutato durante il follow-up di 96 settimane (13 visite) e dopo 8 settimane dalla chiusura del protocollo.

Gli endpoint di sicurezza utilizzati per raggiungere gli obiettivi primari sono:

- breve termine (0-24 ore): sopravvivenza globale, sicurezza generale e tollerabilità, cambiamenti nelle condizioni neurologiche non correlate alla malattia, percentuale di successo della procedura di somministrazione intratecale;
- medio termine (giorno 1-14): sopravvivenza globale, sicurezza generale e tollerabilità, cambiamenti nelle condizioni neurologiche non correlate alla malattia;
- lungo termine (settimana 2-96): sopravvivenza globale, sicurezza generale e tollerabilità, incidenza a lungo termine di tumori maligni, percentuale di soggetti con mortalità correlata al trattamento, valutazione della qualità di vita, cambiamenti nelle condizioni neurologiche.

Dall'approvazione della sperimentazione clinica STEMS (05/2017) a oggi (02/2020), sono stati trapiantati tutti i 12 pazienti previsti. Il follow-up dell'ultimo paziente terminerà a maggio 2021. Nessun evento avverso acuto di grado ≥ 3 che potrebbe essere correlato alla somministrazione di hNPCs, alla procedura o alla somministrazione di immunosoppressivi è stato ad oggi registrato nei 12 pazienti trattati. Durante lo studio sono stati analizzati parametri biochimici, clinici, e neuroradiologici, e sono stati raccolti campioni biologici per future indagini da effettuarsi a completamento del protocollo clinico (05/2021). Le cellule staminali neurali rappresentano una novità nelle neuroscienze rigenerative grazie al loro potenziale terapeutico. In particolare, studi preclinici, e i più recenti studi su pazienti con patologie neurodegenerative, hanno aper-

to enormi speranze sul possibile impiego di queste cellule nella pratica clinica. Dai dati di sicurezza fino ad ora disponibili non emergono effetti collaterali di rilievo direttamente correlabili alle cellule staminali stesse. Il monitoraggio dei pazienti trattati ha evidenziato la sicurezza del trattamento immunosoppressivo introdotto per favorire l'attecchimento delle cellule, e della somministrazione intratecale che pone le cellule staminali in un ambiente più fisiologico rispetto alla via endovenosa. Pur non potendo prevedere i possibili effetti terapeutici delle cellule staminali, questo studio fornisce importanti dati di sicurezza e metodologici per valutare la reale fattibilità della terapia cellulare nella SMP, ponendo le basi per futuri studi su più ampie casistiche di pazienti.

Neural Stem Cell Transplantation in multiple sclerosis patients: a phase I study

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, immune-mediated, inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). Three major forms of the disease are recognized: relapsing-remitting MS (RRMS) (80% of cases), of which 2/3 evolve into primary progressive MS (PPMS), and secondary progressive MS (SPMS) (20% of cases). Although disease-modifying drugs are available for RRMS subjects, treatments for subjects with progressive MS are mostly limited to symptomatic therapies. Treatment of RRMS has changed significantly since the introduction of Interferon- β -1b as a therapeutic option in the early '90s. In the past 20 years, multiple disease-modifying agents have been approved throughout the years, although none is completely able to prevent new relapses or limit the accumulation of disability. Therapy of MS has two main goals: targeting acute relapses to limit their duration and residual effects, and target the disease to reduce the number of attacks and prevent accrual of disability. In contrast to the advances in the treatment of relapsing MS, no effective treatment is available for patients who have the progressive form of the disease. Studies have shown that PPMS lesions have a less clear inflammatory profile, with consistent microglia activation and neuroaxonal loss, leading to grey matter damage. These peculiarities lead to the typical chronic and relentless progressive evolution of the disease. Cell-Based Medicinal Products (CBMP) is proposed as a new option for these patients similarly to what has been done for other neurodegenerative disorders. Human fetal Neural Precursor Cells (hfNPCs) represent a valuable option in MS for two main reasons: 1) hfNPC can migrate in areas of the CNS that are injured, and promote neurorepair and neuroprotection by

interacting with astrocytes and microglia; 2) transplanted cells can also release soluble molecules and express immune-relevant receptors which can stimulate the immunomodulatory and repair function of endogenous neural stem cells that are recruited in the damaged area. The primary objective of the STEMS study was to evaluate the feasibility, safety and tolerability of administered human fetal Neural Precursor Cells (hfNPCs) in patients affected by progressive MS leveraging their extensively pre-clinically assessed therapeutic by-stander potential.

The STEMS clinical protocol

Non-immortalized hfNPCs obtained from a single 10-12 week post-conception human fetus were administered intrathecally through a lumbar puncture in 12 subjects, divided in four cohorts (3 patients each). Each cohort received a single escalating dose of cells. The clinical study has been designed to evaluate the safety of an Advanced Therapy Investigational Medicinal, and its associated procedures. The potential risk associated to this new technology, procedure and immunosuppression regimen, is well balanced by the potential benefit of a innovative therapy for patients with no available therapeutic options. Patients that met inclusion criteria, signed the informed consent and initiated an immunosuppressive pretreatment (Tacrolimus) to prevent hfNPC rejection. Prior to infusion, patients were re-evaluated and treated with prednisone. Follow up was conducted for 96 weeks after administration and covered clinical monitoring for survival, safety, tolerability and overall changes in the neurological status, assessed through neurological examinations, neurological tests, magnetic resonance scans, Multimodal Evoked

Potential and Optical Coherence Tomography studies. Further, longitudinal (before and three months after transplant) cerebrospinal fluid (CSF) and plasma analyses (proteins and metabolites) were performed.

The safety endpoints (primary goals) are the followings:

a) short term (0-24 hours): global survival, general safety and tolerability, changes in neurological conditions not related to the disease, percent of successful intratecal infusion;

b) medium term (1-14 days): global survival, general safety and tolerability, changes in neurological conditions not related to the disease;

c) long term (2-96 weeks): global survival, general safety and tolerability, long term incidence of malignant cancer, percent of subjects with mortality associated to the treatment, quality of life, changes in neurological conditions.

As today (02/2020), since the approval of the clinical study STEMS (05/2017), 12 patients received the treatment. The follow-up of the last patient will end in May 2021. As of now, the clinical profile did not change significantly and the procedure has been proved to be safe and tolerable in

all patients. No severe adverse reactions (grade ≥ 3), which could be related to the hfNPC administration, the procedure, or the immunosuppressive treatment, have been reported. The analysis of biochemical, clinical, and neuro-radiological parameters is ongoing. Biological samples have been collected for future analysis.

Neural stem cells play a crucial role in CNS tissue repair. The therapeutic potential of NSCs has been demonstrated in many 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. Overall, we can ascertain that the infusion procedure is safe and was well tolerated by all subjects. Although reserving judgment on the therapeutic effects of stem cells, we conclude that the therapy is feasible, safe and tolerable. Based on those clinical evidences and acknowledging some interesting remodeling of the metabolic CSF profile of the subjects treated so far, we believe that a Phase II clinical trial on a larger cohort of subjects with a unique high dose of cells is worthy.

Cellule Staminali Mesenchimali per la Sclerosi Multipla (MESEMS)



Antonio Uccelli

Dipartimento di Riabilitazione, Neuroscienze, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-infantili (DINOGLI), Università degli Studi di Genova e Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Ospedale Policlinico San Martino, Genova

PARTECIPANTI ALLO STUDIO / PARTICIPANTS IN THE STUDY

Comitato scientifico dello studio MESEMS

Members of the International Trial Steering Committee (ISC) of the MESEMS trial:

Antonio Uccelli (Co-Principal Investigator), University of Genova, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova Italy; Mark S. Freedman, (Co-Principal Investigator), University of Ottawa and the Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada; Lou Brundin, Karolinska Institutet, Stockholm Sweden; Michel Clanet, CHU Toulouse, Université Paul Sabatier, INSERM UMR 1043, Toulouse France; Oscar Fernandez, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Regional University Hospital of Malaga, Malaga, SPAIN; Seyed Massood Nabavi, Royan institute for stem cell biology and technology, Royan, Iran, ACCR, Iran and Regenerative Biomedicine center, MS, Neurology clinic and research unit, Tehran, Iran; Paolo A. Muraro, Department of Brain Sciences, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, UK; Roberto S. Oliveri, Cell Therapy Unit, Department of Clinical Immunology, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Ernst W. Radue, Medical Image Analysis Centre Basel (MIAC AG) Basel, Switzerland; Johann Sellner, Department of Neurology, Christian Doppler Medical Center, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria. Per Soelberg Sorensen Danish MS Center Department of Neurology, University of Copenhagen and Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Maria Pia Sormani, University of Genoa, Genoa, Italy; Jens Thomas Wuerfel, Medical Image Analysis Centre Basel (MIAC AG), University Basel, Switzerland

Gruppo indipendente di scienziati per la valutazione della sicurezza dello studio MESEMS

Members of the Independent Safety Data Monitoring Committee

Nicola De Stefano: MRI expert, University of Siena, Italy; Alan Tyndall: Stem-cell therapy expert, University of Basel, Switzerland; Jeffrey Cohen: Neurologist specialized in MS with experience in clinical trial to assess MSC, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA; Cris Constantinescu: Neurologist with expertise in neuroimmunology related to MS, University of Nottingham, UK

Gruppo di studio MESEMS

Members of the MESEMS study group

Antonio Uccelli, Alice Laroni, University of Genova and IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy; Martino Introna, Center of Cellular Therapy "G. Lanzani", Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy; Gianvito Martino, Neuroimmunology Unit,



Department of Neuroscience, Institute of Experimental Neurology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; Bruno Bonetti, University of Verona, Verona, Italy, Giancarlo Comi, Department of Neurology and Institute of Experimental Neurology, Vita-Salute San Raffaele University, San Raffaele Hospital, Milan, Italy; Lou Brundin, Karolinska Institutet, R3:04 Karolinska University Hospital, Stockholm Sweden; Michel Clanet CHU Toulouse, Université Paul Sabatier, INSERM UMR 1043, Toulouse France; Óscar Fernández, Institute of Biomedical Research (IBIMA). Regional University Hospital of Malaga, Malaga, Spain; Guillermo Izquierdo Ayuso, Hospital Vithas, Sevilla, Spain; Eduardo Aguera-Morales, Department of Neurology, Reina Sofía University Hospital, IMIBIC University of Cordoba, Spain; Concepción Herrera, Department of Hematology and Cell Therapy Unit, Reina Sofía University Hospital, IMIBIC University of Cordoba, Spain; Cristina Ramo Tello, Neuroscience Department, Hospital Germans Trias-i-Pujol, Badalona, Spain; Seyed Massood Nabavi, Naser Aghdami, Shahedeh Karimi, Leila Arab, Regenerative Biomedicine Center, Royan Institute of Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran; Paolo A. Muraro, Department of Brain Sciences, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, UK; Rehiana Ali, Imperial College London, London UK; Richard Nicholas, Imperial College Healthcare Trust, London, UK; David Miller, University College London, London UK; Francesco Dazzi, King's College, London UK; Roberto S. Oliveri, Cell Therapy Unit, Department of Clinical Immunology, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Ernst W Radue, Medical Image Analysis Centre Basel (MIAC AG) Basel, Switzerland; Johann Sellner, Department of Neurology, Christian Doppler Medical Center, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria; Eva Rohde, Department of Blood Group Serology and Transfusion Medicine, Paracelsus Medical University Hospital Salzburg, Salzburg, Austria; Mario Gimona, GMP Unit, Spinal Cord Injury and Tissue Regeneration Center, Salzburg (SCI-TReCS), Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria; Dirk Strunk, Institute of Experimental and Clinical Cell Therapy, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria; Per Soelberg Sorensen, Morten Blinkenberg, Danish MS Center Department of Neurology, University of Copenhagen and Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Maria Pia Sormani, Department of Health Sciences, University of Genoa, Genoa, Italy; Jens Thomas Wuerfel, Medical Image Analysis Centre Basel (MIAC AG) and Department of Biomedical Engineering, University Basel, Switzerland; Mario A. Battaglia, Italian Multiple Sclerosis Foundation, Genoa, and Department of Life Sciences, University of Siena, Siena, Italy; Mark S. Freedman, Department of Medicine, Neurology, University of Ottawa and the Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada; Heather MacLean, Carolina Rush, H. Rabinovitch, University of Ottawa and the Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada; James Marriott, Ruth Ann Marrie David Szwajcer, Donna Wall, Reza Vosoughi, Juan Racosta, Max Rady College of Medicine, Rady Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia del sistema nervoso centrale (cervello e midollo spinale) causata da un attacco del sistema immunitario alla mielina. Nella SM, diverse ondate di attacco del sistema immunitario alla mielina causano, a lungo andare, e talvolta dopo molti anni, la morte dei neuroni. La morte dei neuroni si traduce, per la persona con SM, in una disabilità irreversibile. Abbiamo oggi a disposizione, fortunatamente, molte terapie per la SM che colpendo il sistema immunitario diminuiscono l'attacco alla mielina; tuttavia, l'effetto delle terapie sulla morte dei neuroni è meno soddisfacente, e non sempre esse riescono a limitare in modo significativo l'instaurarsi della disabilità.

In questo contesto, le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano una promessa per molte loro proprietà. Le MSC sono cellule che possono essere isolate da diversi tessuti dell'organismo, incluso il midollo osseo, il tessuto adiposo, la placenta ed altri. Le MSC sono in grado di dare luogo a cellule cartilaginee, adipose e ossee; ma oltre a questa proprietà "rigenerativa", esse hanno una forte attività anti-infiammatoria, e la capacità di produrre sostanze che proteggono i tessuti dal danno. Per tale motivo, negli anni 2000 il nostro laboratorio ha provato a studiare se le MSC potessero essere una terapia per la SM sperimentale, nell'animale da laboratorio, dimostrando, per la prima volta, che le MSC, quando vengono somministrate per via endovenosa, sono in grado di migliorare il decorso dell'encefalite autoimmune sperimentale (EAE) un modello di SM sperimentale, diminuendo l'infiammazione e la neurodegenerazione quando gli animali erano trattati nella fase acuta di malattia. Per capire se le MSC fossero efficaci anche nelle persone con SM, era quindi necessario progettare una sperimentazione clinica. Negli anni sono stati effettuati infatti, da molti altri gruppi, diversi studi con MSC su piccoli gruppi di persone con SM; la dimensione piccola di tali studi non permette, tuttavia, di capire se le MSC siano efficaci o meno, né se siano sicure e prive di effetti collaterali nella SM.

RISULTATI

Lo studio MESEMS (acronimo che sta per "cellule staminali mesenchimali per la terapia della sclerosi multipla") è una sperimentazione clinica internazionale, nata, quindi, per rispondere alla domanda: le cellule staminali mesenchimali sono una possibile terapia per la SM? Questa sperimentazione è nata dall'unione di un gruppo di scienziati di 9 Paesi diversi, guidati da Antonio Uccelli (Università di Genova) e Mark S. Freedman (Ottawa University) che hanno progettato lo studio clinico. Le importanti risorse economiche necessarie alla realizzazione della sperimentazione non sono derivate, come quando si sperimenta un farmaco, da aziende farmaceutiche, ma da enti no-profit, e tra queste lo sponsor principale dello studio MESEMS è stato la Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, tramite il Progetto Speciale MESEMS. Altre fondazioni che hanno contribuito sono: European Committee for Multiple Sclerosis,

Multiple Sclerosis International Foundation, The Danish Multiple Sclerosis Society, The Toyota Foundation, Danish Blood Donors' Research Foundation, Spinal Cord Injury and Tissue Regeneration Center Salzburg, Paracelsus Medical University, ARSEP Foundation, AFM (France), UK MS Society, NIHR Biomedical Research Centre funding scheme to Imperial College, NIHR Imperial Clinical Research Facility, The Multiple Sclerosis Society of Canada, the Multiple Sclerosis Scientific Research Foundation, e Research Manitoba. Il contributo di FISM e degli altri enti ha permesso di realizzare la sperimentazione, che è stata condotta in 8 Paesi e i cui dati sono stati raccolti in un database centrale presso la CRO Latis, a Genova.

Lo studio MESEMS è uno studio in doppio cieco, randomizzato di fase 2 il cui obiettivo è stato verificare se la terapia con MSC prelevate dal midollo osseo sia priva di effetti collaterali e in grado di diminuire l'infiammazione misurata come sviluppo di lesioni attive (che assumono contrasto) alla risonanza magnetica (RM). Per realizzare tale obiettivo, sono stati arruolate nello studio 144 persone con SM, con forma di malattia a ricadute e remissioni, secondariamente progressiva o primariamente progressiva purchè attiva. Ogni persona arruolata è andata incontro, all'inizio dello studio, a prelievo di una piccola quantità di midollo osseo, in anestesia. Dal midollo osseo sono state isolate e espanse le MSC, in laboratori certificati per la coltivazione di cellule ad uso terapeutico. A questo punto le persone sono state divise, tramite dei codici di randomizzazione, in due gruppi: metà di esse ha ricevuto una infusione endovenosa di MSC e l'altra metà un'infusione di una soluzione identica ma senza cellule (placebo); dopo sei mesi i gruppi si sono invertiti, con una seconda infusione endovenosa per cui chi aveva ricevuto le MSC è stato infuso con placebo e viceversa. Per un anno, dalla prima infusione, le persone arruolate hanno effettuato visite cliniche e risonanze magnetiche a tempi prestabiliti. Né le persone arruolate, né i medici che le seguivano, erano a conoscenza dell'ordine delle terapie (il MESEMS è dunque uno studio "in doppio cieco"). Le RM sono state tutte analizzate presso il MIAC, un centro di analisi delle immagini di Basilea, in Svizzera, guidato da Jens Wuerfel.

Al termine dello studio, dopo l'apertura dei codici che ha permesso di capire a quale trattamento il paziente fosse stato sottoposto, i dati sono stati uniti e analizzati. I primi risultati disponibili dell'analisi dicono che la terapia con MSC è sicura e priva di effetti collaterali; tuttavia, essa non diminuisce la possibilità di sviluppare lesioni attive alla RM. È in corso l'analisi dei dati clinici e degli altri dati di RM, per verificare se le MSC abbiano un effetto sulle ricadute, sulla progressione di disabilità, o su misure in RM di riparazione del danno; e per capire se siano efficaci in particolari sotto-gruppi di pazienti. Inoltre, è in corso l'analisi degli studi sull'effetto delle MSC su cellule del sistema immunitario e su altri parametri di funzionamento del sistema immunitario nella SM, per capire come tale terapia impatta sulle alterazioni del sistema immunitario che sono alla base della SM; e su altri parametri, come quelli cognitivi.

CONCLUSIONI

Questo studio avrà ricadute importanti a breve termine per le persone con SM che potranno sapere se le MSC possano essere una terapia per la SM, evitando il “turismo terapeutico” promosso da persone con pochi scrupoli

che promettono risultati non suffragati da prove. I risultati dell'analisi in corso, inoltre, permetteranno di capire se sia scientificamente ragionevole progettare una successiva sperimentazione, ad esempio su sotto-gruppi di pazienti in cui la terapia abbia mostrato risultati.

MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS)

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a disease of the central nervous system (brain and spinal cord) caused by an attack of the immune system to the myelin. In MS, several waves of inflammation in the CNS eventually lead to neuronal damage and death, sometimes many years after. The death of neurons translates, for the person with MS, into an irreversible disability. Today many therapies for MS are available which, by affecting the immune system, decrease the attack on myelin; however, the effect of therapies on neuron death is less satisfactory, and they do not always manage to significantly limit the onset of disability.

In this context, mesenchymal stem cells (MSCs) represent a promise for many of their properties. MSCs are cells that can be isolated from different tissues in the body, including the bone marrow, adipose tissue, the placenta and others. MSCs are able to give rise to cartilage, fat and bone cells; but in addition to this “regenerative” property, they have a strong anti-inflammatory activity, and the ability to produce substances that protect the tissues from damage. For this reason, in the 2000s our laboratory carried out an experimental study to assess whether MSCs could be a therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) a model of MS induced in mice, demonstrating, for the first time, that MSCs, when administered intravenously, are able to improve the course of EAE, decreasing the inflammation and death of neurons.

Next step to understand whether MSCs are also effective in people with MS, was to perform a clinical trial. Indeed, over the years, several studies with MSC had been carried out by many other groups on small groups of people with MS, but the small size of these studies did not allow to understand if MSCs are effective or not, nor if they are safe and free of side effects in MS.

RESULTS

The MESEMS study (acronym for “MEsenchymal StEm cells for the treatment of Multiple Sclerosis”) is an international clinical trial, designed to answer the question: are mesenchymal stem cells a possible therapy for MS? This

study was born from the union of a group of scientists from 9 different countries, led by Antonio Uccelli (University of Genoa) and Mark S. Freedman (Ottawa University) who designed the clinical study. The important economic resources necessary to carry out the experimentation were not derived, as when testing a drug, from pharmaceutical companies, but from non-profit foundations, and among these the main sponsor of the MESEMS study was the Italian Multiple Sclerosis Foundation, through the Special Project MESEMS. Other foundations that have contributed are: European Committee for Multiple Sclerosis, Multiple Sclerosis International Foundation, The Danish Multiple Sclerosis Society, The Toyota Foundation, Danish Blood Donors' Research Foundation, Spinal Cord Injury and Tissue Regeneration Center Salzburg, Paracelsus Medical University, ARSEP Foundation, AFM (France), UK MS Society, NIHR Biomedical Research Center funding scheme to Imperial College, NIHR Imperial Clinical Research Facility, The Multiple Sclerosis Society of Canada, the Multiple Sclerosis Scientific Research Foundation, and Research Manitoba. The contribution of FISM and the other bodies allowed to carry out the experimentation, which was conducted in 8 countries and whose data were collected in a central database at the CRO Latis, in Genoa, Italy.

MESEMS is a double-blind randomized phase II clinical trial whose objective was to verify whether the therapy with MSC isolated from the bone marrow is free of side effects and capable of decreasing inflammation, measured as the development of active (gadolinium enhancing) magnetic resonance imaging (MRI) lesions, in MS. To achieve this goal, 144 people with MS, with relapsing remitting, secondary progressive or primary progressive form of disease, showing evidence of disease activity, was enrolled in the study. At the beginning of the study, a small volume of bone marrow was drawn from each participant under anesthesia. MSCs were then isolated and expanded from the bone marrow in certified laboratories for the cultivation of cells for therapeutic use. At this point patients were randomized, through codes, into two groups: half of

them received an intravenous infusion of their own MSC, and half placebo; after six months those patients who received at first MSC were infused with placebo and vice-versa. For one year, following the first infusion, enrolled people underwent clinical visits and magnetic resonances at given time points. Neither enrolled people, nor the doctors who followed them, were aware of the order of the therapies (MESEMS is therefore a “double-blind” study). MRIs were all analyzed at the Magnetic resonance Image Analysis Center (MIAC) in Basel, Switzerland, led by Jens Wuerfel.

At the end of the study the codes were unblinded, the data were merged and analyzed. The first available results of the analysis demonstrate that MSC therapy is safe and free of side effects; however, it does not decrease the possibility of developing active MRI lesions. The analysis of clinical data and other MRI data is underway, to verify whether MSCs have an effect on relapses, on the progression of disability, or on MRI measures to repair damage;

and to understand if they are effective in particular sub-groups of patients. Furthermore, studies are underway on the effect of MSCs on cells of the immune system and on other functioning parameters of the immune system in MS, to understand how this therapy impacts the alterations of the immune system that underlie MS; and on other parameters, such as cognition.

CONCLUSIONS

This study will have important short-term effects for people with MS, who will know whether MSCs can be a therapy for MS, hopefully limiting “therapeutic tourism” promoted by people for economical reasons without scientific evidence supported by tests. The results of the ongoing analysis will also allow us to understand whether it is scientifically reasonable to plan a subsequent trial, for example on sub-groups of patients in which the therapy has shown results.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- Uccelli A, Laroni A, Brundin L, Clanet M, Fernandez O, Nabavi SM, Muraro PA, Oliveri RS, Radue EW, Sellner J, Soelberg Sorensen P, Sormani MP, Wuerfel JT, Battaglia MA, Freedman MS; MESEMS study group. MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*. 2019 May 9;20(1):263. doi: 10.1186/s13063-019-3346-z

Progetto speciale FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 1.913.250 €
FISM special project funded in 2013 and the amount of € 1,913,250

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 Matarese¹ (PI) e Luca Battistini² (Co-PI)

¹Istituto 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

²IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

COLLABORATORI, CENTRI RECLUTATORI / COLLABORATORS, RECRUITING CENTERS
Vincenzo Brescia Morra, Roberta Lanzillo, Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

Ciro Florio, Giorgia Teresa Maniscalco, Centro Regionale per la diagnosi e cura della Sclerosi Multipla - AOU "Antonio Cardarelli", Napoli

Diego Centonze, Istituto Neurologico Mediterraneo, Neuromed, Pozzilli, Isernia

Claudio Gasperini, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale S. Camillo-Forlanini, Roma

Marco Salvetti, Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma

Le malattie autoimmunitarie sono patologie spesso invalidanti che portano alla distruzione da parte del sistema immunitario dei costituenti e degli organi del nostro corpo a causa della perdita della tolleranza immunologica. Per esempio, nella sclerosi multipla (SM) si evidenzia la distruzione della guaina mielinica responsabile della conduzione degli impulsi nervosi. La frequenza di tali patologie appare in costante aumento nelle società avanzate e opulente e nonostante i grandi passi avanti fatti dalla ricerca, i meccanismi alla base della perdita della tolleranza immunologica non sono stati ancora completamente identificati.

Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è concentrata su una popolazione linfocitaria di "cellule sentinella" dette cellule T regolatorie (Treg), che hanno un ruolo nello sviluppo di questo tipo di patologie. Diversi studi hanno evidenziato che le alterazioni del metabolismo (come l'obesità), sempre più comuni nelle società con maggior benessere, potrebbero essere associate alle disfunzioni della risposta immunitaria, caratteristiche della SM, soprattutto

a carico delle cellule Treg, che in queste condizioni sono incapaci di svolgere in modo appropriato la loro funzione di mantenimento della tolleranza immunologica nei confronti dell'organismo. Infatti, è stato riportato che esiste una forte relazione tra lo stato metabolico di un individuo e la tolleranza immunologica e che un aumento del "carico metabolico" può essere associato con la perdita della tolleranza verso gli organi "self".

Dati sperimentali dimostrano che sia il digiuno acuto che la restrizione calorica (RC) cronica sono in grado di migliorare l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello animale di SM, sia attraverso la riduzione dell'infiammazione che attraverso l'induzione della produzione di citochine neuroprotettive. Inoltre, dati recenti hanno indicato che regimi alimentari associati alla rimozione di alimenti "pro-infiammatori" come il latte vaccino, i derivati del latte e il glutine, possono avere un impatto positivo su malattie autoimmunitarie, come le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) e il diabete giovanile autoimmu-

nitario, cambiando la composizione del microbiota intestinale e riducendo l'infiammazione. Studi epidemiologici longitudinali hanno evidenziato un'aumentata incidenza di SM in popolazioni in cui si registra un alto consumo di prodotti a base di latte e derivati. Inoltre, in uno studio norvegese, sono stati rilevati anticorpi contro il glutine nel sangue dei pazienti affetti da SM con una maggiore frequenza rispetto a soggetti di controllo. A supporto di questi dati, 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. Molti di questi problemi possono essere ricondotti al mimetismo molecolare, un fenomeno per cui le proteine di alimenti come il latte e il glutine sono simili a molecole dell'organismo e questa somiglianza può causare una cross-reattività che porta a disturbi autoimmunitari con rottura della tolleranza come nel caso della SM, la celiachia (CD) e la neuromielite ottica.

Sebbene, i farmaci approvati per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (SM-RR) si siano rivelati in grado di ridurre i tassi di recidiva, il loro impatto sulla progressione della malattia a lungo termine e sulla disabilità neurologica irreversibile rimane in gran parte ancora poco chiaro, sottolineando pertanto la necessità di nuove strategie terapeutiche.

Nonostante sia stato evidenziato che sia il digiuno acuto che la restrizione calorica cronica sono in grado di miglio-

rare il decorso della SM in modelli animali di questa patologia, non sono stati mai condotti studi specifici nell'uomo volti a determinare a livello cellulare e molecolare il meccanismo d'azione della RC nel contesto della SM. Inoltre, ad oggi non esistono ancora dati sperimentali definitivi sull'effetto della rimozione di alimenti quali il latte vaccino e il glutine sul decorso della SM. Lo scopo del nostro progetto è quello di comprendere come la restrizione calorica sia in grado di controllare i meccanismi alla base della patogenesi della SM e con particolare attenzione ai processi che regolano la funzione delle cellule Treg. L'essenza della nostra idea è quella di migliorare l'andamento della SM e l'efficacia dei trattamenti farmacologici di prima linea (per esempio dimetilfumarato-DMF), modificando lo stato metabolico dell'ospite tramite restrizione calorica con o senza rimozione di specifici alimenti altamente antigenici (glutine/latte) con lo scopo di riequilibrare le risposte immunitarie/infiammatorie dei pazienti con SM.

Questo progetto potrebbe aiutare ad acquisire nuove informazioni sulla patogenesi della SM e dovrebbe fornire le basi molecolari che spiegano, almeno in parte, la ragione della crescente prevalenza della SM negli stati più ricchi e 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

Autoimmune diseases are disabling disorders that lead to the destruction of components and organs of our body due to the loss of immunological self-tolerance. For example, multiple sclerosis (MS) is characterized by destruction of the myelin that is responsible for the conduction of nerve impulses. The frequency of these pathologies appears to be constantly increasing in advanced and affluent societies, but the specific reasons are not fully understood and despite the great research progress, the mechanisms underlying the loss of immunological self-tolerance are not yet fully identified.

In the last few years, researchers' attention has focused on a lymphocyte population of "sentinel cells" named regulatory T cells (Treg), which play a key role in the control of immunological self-tolerance. Several studies have

shown that alterations of metabolism (such as obesity), constantly increasing in more developed societies, could be associated with dysfunctions of the immune responses, characteristic of MS, especially affecting Treg cells, which in these conditions are unable to properly perform their function in maintaining immunological self-tolerance. Indeed, it has been reported that there is a strong relationship between the metabolic state and the immunological tolerance. In this context, the increased "metabolic pressure" can associate with the loss of tolerance towards "self" antigens.

Experimental data show that both acute fasting and chronic calorie restriction (RC) are able to improve progression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS, through the reduction of inflam-

mation and the induction of neuroprotective cytokine production. In addition, recent data suggest that dietary regimens associated with the removal of “pro-inflammatory” foods such as cow’s milk and gluten may have a positive impact on autoimmune diseases, such as chronic inflammatory bowel disease (IBD) and autoimmune juvenile diabetes, changing the composition of the intestinal microbiota and reducing inflammation. Longitudinal epidemiological studies have shown an increased incidence of MS in populations with high consumption of milk-based products and derivatives. In addition, a Norwegian study reported the presence of antibodies against gluten in the blood of MS patients more frequently than in control subjects. 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. Many of these reactions can be ascribed to molecular mimicry a phenomenon whereby the proteins of foods such as milk and gluten are similar to the body’s molecules and this similarity can cause a cross-reactivity that leads to autoimmune disorders with the break of immune tolerance as in the case of MS, celiac disease (CD) and optic neuromyelitis. Although, several disease-modifying drugs have been approved for MS treatments and have shown to reduce relapse rates by modulating immune responses, their impact on long-term disease progression and accrual of irreversible neurological disability remains largely unclear, underlining the need for novel therapeutic

strategies. Although it has been shown that both acute fasting and chronic caloric restriction (RC) are able to improve the course of MS in animal models of this pathology, no specific studies have been performed to dissect at the cellular and molecular level the mechanism of action of CR in the context of autoimmunity and MS.

Furthermore, to date, there are no experimental data on the effect of removal of foods such as cow’s milk and gluten on the course of MS. The aim of our project is to understand how mild caloric restriction is able to control the mechanisms underlying the pathogenesis of MS with particular attention to the processes regulating Treg cell function. The essence of our idea is to improve the outcome of MS and the efficacy of first line drug treatments (i.e. dimethylfumarate-DMF) by altering the metabolic state of the host via calorie restriction with or without removal of specific highly antigenic foods (Gluten/milk) with the aim to re-equilibrate immune/inflammatory responses of MS patients.

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 / PUBLICATIONS

- Negri R, Trinchese G, Carbone F, Caprio MG, Stanzone G, di Scala C, Micillo T, Perna F, Tarotto L, Gelzo M, Cavaliere G, Spagnuolo MI, Corso G, Mattace Raso G, Matarese G, Mollica MP, Greco L, Iorio R. Randomised Clinical Trial: Calorie Restriction Regimen with Tomato Juice Supplementation Ameliorates Oxidative Stress and Preserves a Proper Immune Surveillance Modulating Mitochondrial Bioenergetics of T-Lymphocytes in Obese Children Affected by Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Clin Med.* 2020 Jan 4;9(1).
- Terrazzano G, Bruzzaniti S, Rubino V, Santopalo M, Palatucci AT, Giovazzino A, La Rocca C, de Candia P, Puca A, Perna F, Procaccini C, De Rosa V, Porcellini C, De Simone S, Fattorusso V, Porcellini A, Mozzillo E, Troncone R, Franzese A, Ludvigsson J, Matarese G, Ruggiero G, Galgani M. Type 1 diabetes progression is associated with loss of CD3+CD56+ regulatory T cells that control CD8+ T-cell effector functions. *Nature Metabolism* volume 2, pages142–152(2020).
- Sambucci M, Gargano F, Guerrera G, Battistini L, Borsellino G. One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells’ Multiple Identities in Neuroimmunity. *Front Immunol.* 2019 Dec 20;10:2947. doi: 10.3389/fimmu.2019.02947. eCollection 2019. Review
- Vuotto C, Battistini L, Caltagirone C, and Borsellino G. Gut microbiota and disorders of the central nervous system. *The Neuroscientist* 2020, in press

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2018 e l'ammontare di 254.582€
FISM Special Project funded in 2018 and the amount of € 254,582

Vaccino con Bacillo di Calmette-Guérin nella sindrome radiologicamente isolata



Giovanni Ristori

Sapienza Università di Roma, Roma

LISTA DEI PARTECIPANTI AL PROGETTO / LIST OF THE PARTECIPANTS INVOLVED IN THE PROJECT

*CENTERS, Ospedale S. Andrea, Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma
Dipartimento di Medicina Chirurgia e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena
Dipartimento NEUROFARBA, Università degli Studi di Firenze, Firenze
Laboratorio di Immunologia - IEOS - CNR, Napoli
The identification of the recruiting Centers was conducted in collaboration with the Italian RIS/MS Study Group (Prof. Amato, Florence).
Rome CENTERS, where the applicant works, supervises study organization and conduction at the different Centers.
The Quantitative Neuroimaging Lab (QNL, responsible: Prof. Nicola De Stefano) of the University of Siena will be in charge of MRI data analysis.
Prof. Maria Pia Sormani of the Department of Health Sciences, University of Genova, will supervise the statistical analysis.
The laboratory of Immunology - IEOS-CNR (responsible: Prof. Giuseppe Matarese) will perform the ex-vivo experiments and the statistical analysis on the immune-metabolic profile of RIS people.*

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, problemi legati alla qualità della vita e al rischio di super-trattamento rimangono importanti per i pazienti. Approcci sicuri che possono essere utilizzati dall'inizio (biologico) della malattia, senza importanti rischi di effetti collaterali, non sono ancora alla portata della comunità scientifica.

Il vaccino contenente Bacille Calmette-Guérin (BCG) può avere queste caratteristiche poiché è risultato avere un effetto benefico in pazienti con SM precoce e in soggetti con primo episodio demielinizzante. Essendo sicuro, economico e di facile utilizzo, abbiamo proposto 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; Okuda et al. 2009). Sarà condotto uno studio multicentrico, in doppio cieco, controllato con placebo. Cento persone con RIS saranno 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 al 'baseline' e 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 Matarese ai mesi 6, 12, 24, 36.

L'end-point primario dello studio sarà il numero di lesioni "attive" in risonanza magnetica dell'encefalo durante il follow-up (i dati neuroradiologici saranno analizzati presso il Quantitative Neuroimaging Lab - responsabile: Prof. N. De Stefano dell'Università di Siena). L'end point secondario sarà il tempo di occorrenza del primo evento clinico durante i 3 anni di follow-up. Saranno anche ottenuti altri end-point secondari di risonanza magnetica dell'encefalo. Un'analisi multiparametrica sarà applicata per monitorare le variazioni nel profilo immuno-metabolico dei partecipanti allo studio prima e dopo vaccinazione con BCG. Saranno valutati la sicurezza e la fattibilità di questo approccio.

Dopo un ritardo iniziale dovuto alla mancata disponibilità del vaccino dalle fonti precedentemente utilizzate (Pasteur and Danish strains), è stato acquisito un ceppo Polacco che ha consentito lo start dello studio a fine 2019.

La procedura, che ha comunque richiesto un tempo prolungato, è stata implementata in parallelo con l'identificazione di 20 Centri partecipanti al processo di reclutamento, che coprono l'intero territorio nazionale. Questo step consentirà di ottimizzare il processo di reclutamento, per nulla scontato, considerando la rarità della condizione delle persone con RIS.

Il protocollo e la documentazione allegata sono stati sottomessi e approvati da AIFA Osservatorio e dal Comitato Etico del PI. Il Centro del PI ha incluso 3 persone.

Il protocollo sarà presto sottomesso al Comitato Etico degli altri Centri identificati dopo la preparazione di un emendamento non sostanziale.

Bacille Calmette-Guérin vaccine in radiologically isolated syndrome

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; Okuda et al. 2009).

A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial will be conducted in the context of the activity of the Center for Experimental Neurological Therapies (CENTERS - a special project by the Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM). We will randomize 100 persons with RIS according to Okuda criteria (Neurology 2009): 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 (responsible: Prof. N. De Stefano) 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.

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 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 will soon be submitted to the other Centers identified, after the preparation of a protocol's amendment.



PUBBLICAZIONI / PUBLICATIONS

- 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 FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 220.000 €
FISM Special Project funded in 2017 and the amount of € 220,000

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

Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena

LISTA DEI CENTRI / LIST OF CENTERS

Marco Capobianco, CDO neurologia, AOUS San Luigi, Orbassano, Torino

Marco Salvetti, Sapienza Università di Roma, Roma

Francesco Patti, Università degli Studi di Catania, Catania

Alice Laroni, Università degli Studi di Genova, Genova

Claudio Gasperini, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma

Viviana Nociti, Fondazione Policlinico Universitario 'A. Gemelli', Roma

Maria Pia Amato, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Diego Centonze, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo, NEUROMED Pozzilli, Isernia

Elio Scarpini, Fondazione Ca' Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Luca Massacesi, Ospedale Universitario Careggi, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Alessandra Lugaresi, UOSI Riabilitazione Sclerosi Multipla, Ospedale Bellaria, Bologna

Roberta Lanzillo, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

Sauro Severi, Ospedale San Donato, Arezzo

Maria Letizia Bartolozzi, Struttura ospedaliera complessa neurologia Ospedale San Giuseppe, Empoli

Giuseppe Meucci, Presidio ospedaliero di Livorno, Livorno

Mario Falcini, Ospedale Misericordia e Dolce, Prato

Katrin Plewnia, Ospedale della Misericordia Grosseto, Grosseto

Gino Volpi, Ospedale San Jacopo di Pistoia, Pistoia

Nicola De Stefano, Dipartimento Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena

Cristina Frittelli, Ospedale Felice Lotti, Pontedera

Fioravante Capone, Università Campus Bio-Medico di Roma, Roma

Maura Pugliatti, Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico-Specialistiche, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Luisa Maria Caniatti, U.O. di Neurologia Azienda Ospedaliera universitaria S. Anna, Ferrara

Livia Pasquali, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Pisa, Pisa

Le persone con SM possono avere una maggiore suscettibilità alle infezioni rispetto alla popolazione generale a causa di alterazioni del sistema immunitario correlate all'uso di farmaci e al grado di disabilità. L'uso di farmaci immunosoppressori e/o immunomodulanti 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. Considerate le gravi complicanze infettive associate all'uso di immunosoppressori usati per trattare la SM, sarebbe consigliabile l'adozione di specifici registri e database per raccogliere e valutare dati riguardanti la sicurezza in questi ambiti dopo l'approvazione dei farmaci. La sicurezza di molti vaccini nei soggetti 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 soggetti 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 malat-

tia come evento avverso della vaccinazione nel periodo di rischio definito. In particolare saranno considerate le vaccinazioni contro epatite A e B, morbillo, rosolia, parotite, varicella, difterite, tetano, pertosse, influenza stagionale, herpes zoster, meningococco e pneumococco. L'attività e la progressione della SM saranno valutate prendendo in considerazione la presenza di ricadute o di progressione della disabilità entro 6 mesi dalla vaccinazione e utilizzando il tasso di ricadute annuo e il suo trend durante il periodo di studio.

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 soggetti 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 2020. 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.

Conoscere lo stato di immunizzazione è cruciale nella pratica clinica per la gestione dei nuovi farmaci modificanti la malattia e per la salute pubblica in generale, e ha la finalità di porre l'attenzione su un'eventuale necessità di una campagna di vaccinazione mirata ai pazienti con SM.

Ad oggi, 18 Centri clinici hanno ricevuto l'approvazione allo studio da parte del rispettivo comitato etico e iniziato l'arruolamento, mentre 7 sono in attesa di risposta.

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

Multiple sclerosis patients are maybe more susceptible to infections than the general population in relation to some specific therapies or increasing disability. The use

of immunosuppressant or immunomodulatory drugs requires particular attention with respect to the possibility of occurrence of infectious events. Moreover, some in-

fectious 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 patients susceptible to infections, considering those unvaccinated or never exposed to natural infections. Concerning the severe infective complications associated with the immunosuppressant agents used to treat MS, the adoption of specific registries and databases to collect and evaluate infection/vaccine safety data after drug approval is advisable. The safety of most 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 of the relevance of vaccinations in the clinical practice.

The aim of the current project on MS patients is two-fold: 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. In particular, any vaccination against hepatitis A and B, measles, mumps, rubella, varicella, tetanus, diphtheria, pertussis, seasonal influenza, herpes zoster virus, meningococcal and pneumococcal bacteria will be considered.

MS activity and progression will be assessed evaluating the occurrence of relapse or disability progression within 6 months from 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 MS subjects 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 titre, 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 will be analysed. The study follow-up period will be between 2 and up to 6 months following 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 knowledge of the immunisation status is crucial for the clinical practice in the management of the new disease modifying drugs (DMDs), and for the public health to establish the possible need of a vaccine campaign targeted to MS patients.

Currently, 18 MS centers have received ethics committee approval and started the enrollment of patients whereas 7 are waiting for a favorable opinion.

Progetto Speciale FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 84.000 €
FISM Special Project funded in 2019 and the amount of € 84,000

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



Federica Eva Esposito

Centro Sclerosi Multipla e Unità di Neuroriabilitazione, Laboratorio di Genetica Umana delle Malattie Neurologiche, Istituto di Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Laura Ferrè, Elisabetta Mascia, Melissa Sorosina, Silvia Santoro, Ferdinando Clarelli, Lucia Moiola, Vittorio Martinelli, Massimo Filippi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

Giorgio Valentini, *Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Milano, Milano*
David Brassat, Béatrice Pignolet, *Toulouse University Hospital, Toulouse, France*
Philip De Jager, *Columbia University, New York, USA*

Nell'ultimo decennio abbiamo assistito a un significativo aumento delle terapie disponibili per i pazienti affetti da sclerosi multipla a ricadute e remissioni (SMRR). La risposta alle terapie è però altamente imprevedibile e variabile da paziente a paziente, rendendo difficoltosa la definizione del trattamento più adatto al singolo soggetto fin dalle primissime fasi della malattia. Ad oggi infatti la risposta ai farmaci per la SM 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 la nostra ricerca farmacogenetica, che si propone di studiare il rapporto tra la componente genetica e la propensione a rispondere a un determinato trattamento. Tale approccio potrebbe portare ad 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 alla luce del suo profilo genetico. È importante considerare che approcci simili vengono già correntemente utilizzati nella terapia di alcuni tipi di tumore e permettono di personalizzare le cure sulla base delle caratteristiche individuali di ciascun paziente.

Un precedente studio condotto presso il nostro centro SM, sempre grazie al supporto di FISM, ha consentito di identificare dei marcatori genetici capaci di predire con buona accuratezza la risposta al trattamento con fingolimod partendo da una coorte di 255 pazienti con SMRR. Nello specifico i pazienti sono stati seguiti all'interno dello studio per 2 anni, al termine dei quali la risposta al trattamento è stata valutata considerando due diversi criteri clinici: da un lato i pazienti sono stati suddivisi in respon-

sivi e non responsivi alla terapia, alla luce del verificarsi di ricadute cliniche e/o dell'evidenza di lesioni attive alla RMN dell'encefalo eseguita durante i primi due anni di trattamento; il secondo criterio utilizzato era volto invece a valutare l'intervallo di tempo che intercorre tra l'inizio del trattamento e il verificarsi della prima ricaduta di malattia. Dopo aver classificato i pazienti abbiamo quindi valutato se vi fossero delle differenze genetiche tra i soggetti che rispondono al trattamento rispetto a chi presenta attività di malattia e attraverso un'analisi condotta su oltre 700.000 varianti genetiche distribuite su tutto il genoma abbiamo identificato degli ipotetici marcatori di risposta. Inoltre, 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. Questo studio ci ha permesso di identificare due gruppi di marcatori genetici, rispettivamente costituiti da 22 e 48 marcatori, che permettono di determinare con elevata accuratezza quali pazienti risponderanno al trattamento e quali invece sono a rischio di presentare una riattivazione di malattia.

Alla luce dei risultati ottenuti nella prima fase dello studio abbiamo quindi sottoposto a FISM il presente progetto, che è la diretta continuazione del precedente, volto a confermare i risultati ottenuti in gruppi indipendenti di pazienti SMRR in terapia con fingolimod, anch'essi seguiti per 2 anni dall'inizio del trattamento. A tal fine abbiamo arruolato un secondo gruppo di 109 pazienti SMRR italiani, seguiti presso il Centro Sclerosi Multipla dell'Ospedale San Raffaele di Milano; abbiamo inoltre creato una

collaborazione con il Prof. Philip De Jager, della Columbia University di New York, che ha contribuito al progetto con 163 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 108 pazienti SMRR francesi.

I dati clinici sono già stati raccolti e confermano l'efficacia della terapia con fingolimod; a 2 anni dall'inizio della terapia infatti circa l'85% dei pazienti non ha presentato ricadute cliniche e solo il 5% dei pazienti ha dovuto interrompere la terapia per inefficacia. È stata quindi effettuata l'analisi genetica della casistica di replicazione italiana, francese e americana. Le analisi definitive volte a validare i marcatori precedentemente individuati e a identificare potenziali nuovi marcatori sono ancora in corso. Una prima meta-analisi effettuata tra i pazienti italiani e quelli americani ha permesso di identificare due regioni cromosomiche associate al tempo alla prima ricaduta. Tali

segnali risultano significativi anche dopo la correzione per test multipli, facendo ritenere che si tratta di risultati attendibili. Nella fase successiva del progetto ci si propone di studiare dal punto di vista funzionale le varianti genetiche direttamente selezionate e le regioni cromosomiche coinvolte, al fine di definire meglio i meccanismi patogenetici coinvolti nel determinare la risposta a fingolimod, attraverso anche la valutazione del ruolo di fenomeni regolatori.

In parallelo stiamo lavorando per confermare l'affidabilità e riproducibilità dei 22 e 48 marcatori genetici precedentemente identificati nel distinguere i pazienti che più probabilmente risponderanno bene al farmaco rispetto a quelli che non risponderanno alla terapia. Se confermati, questo set di marcatori potrebbe essere utilizzato anche nella pratica clinica, per contribuire a identificare fin dalle fasi precoci di malattia quei pazienti che potrebbero maggiormente giovare del trattamento con fingolimod.

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

In the last decade there was a dramatic increase in therapies approved for the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS). Nonetheless, response to therapy is highly heterogeneous and unpredictable, differing for patient to patient, and the identification of the more suitable drug for each patient since the early phase of the disease remains a challenging issue. In fact, as for now, the response to treatment is defined based on the evidence of new symptoms or active lesions at brain MRI performed during therapy. In this setting, pharmacogenetics, that is the discipline studying the relationship between genes and response to drugs, is an approach for optimizing treatment options. The research in this field could in fact allow an improvement in the management for MS patients, identifying patients more likely to respond to a specific drug based on their genetic background. Of note, similar approaches are already applied to cancer treatment, allowing a more personalized approach based on individual patient's characteristics.

In a previous study performed at our MS center thanks to the financial support of FISM, we applied a pharmacogenomics approach to identify genetic markers that predict with good accuracy the response to fingolimod treatment in a set of 255 RRMS patients. Specifically, we followed the patients for 2 years and at the end of this observation period treatment response was evalua-

ted considering two different criteria: first, we classified patients in responders and non-responders based on the evidence of clinical relapses and/or active lesions at the brain MRI performed during the 2-year follow-up; second, we considered the interval of time between the treatment start and the occurrence of the first clinical relapse. After classifying patients according to these criteria we assessed the presence of genetic differences between patients with a good response to drug and patients that showed persistent disease activity despite therapy; thanks to this approach that evaluated more than 700,000 genetic variants distributed along the entire genome, we identified some promising genetic markers of response. Moreover, thanks to the collaboration with Prof. Valentini, from the University of Milan (Milan, Italy), we also applied a machine learning approach to build a predictive model of response to fingolimod treatment. This approach led to the identification of two sets of genetic markers, based on 22 and 48 markers respectively, that yield high accuracy in predicting patients that respond to therapy and patients that do not.

Based on these results, we decided to present the current project to FISM, that is the direct continuation of the previous one, aimed to confirm the observed results in independent cohorts of RRMS subjects, treated with fingolimod and followed for 2 years from treatment start.

For this purpose, we enrolled an independent group of 109 Italian RRMS patients followed at the MS center of the San Raffaele Hospital (Milan, Italy); moreover we started a collaboration with Prof. Philip De Jager, from the Columbia University, who contributed with 163 American RRMS patients followed at the Brigham and Women's Hospital (Boston, USA), and with Prof. David Brassat from Toulouse University Hospital (Toulouse, France), who contributed with 108 French patients.

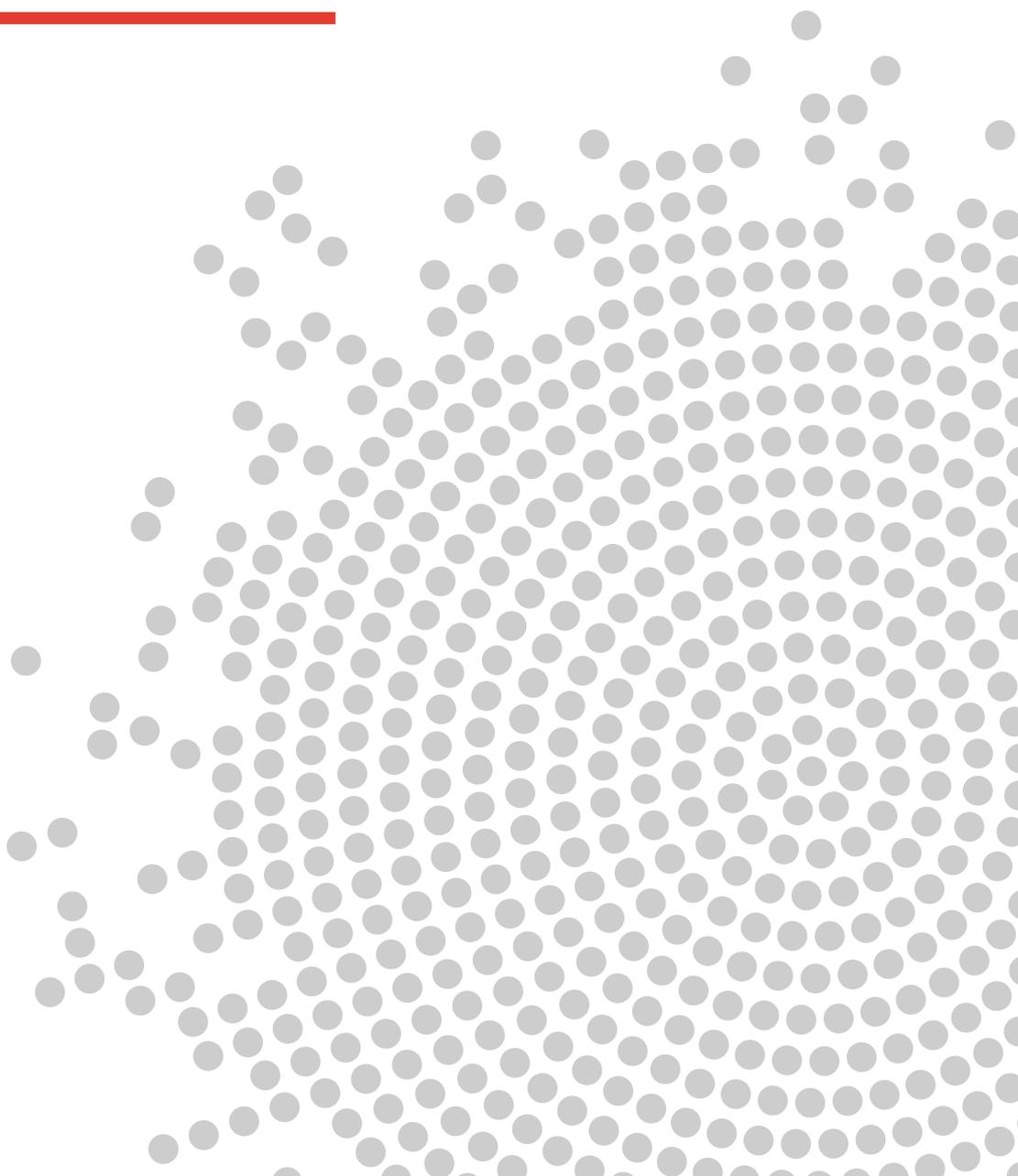
Clinical data confirm the efficacy of fingolimod treatment with 85% of patients free from clinical relapses at 2 years and only 5% of patients discontinuing the drug due to lack of efficacy. The genetic assessment has been performed for all the three replication cohorts and the genetic analyses aimed to validate the markers previously selected and to identify potential new predictive markers are ongoing. A meta-analysis involving the Italian and American cohorts

led to the identification of two interesting signals associated with the time to first relapse; of note, these signals are significant also after correction for multiple testing. The following part of the project is aimed to perform functional experiments on the variants selected from the genetic study, in order to define the mechanisms involved in the response to fingolimod and to assess also the role of regulatory mechanisms.

In parallel we are currently testing the two sets of 22 and 48 genetic markers in the replication cohorts, to verify their accuracy and reproducibility in identifying patients that will respond to fingolimod treatment. If confirmed, these markers could be used in the clinical setting, in order to contribute to identify those patients that would benefit more from fingolimod therapy since the early phases of the disease.

Registro Italiano sclerosi multipla

Italian Multiple
Sclerosis Register



Registro Italiano Sclerosi Multipla

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 140 Centri clinici italiani hanno aderito al progetto e ad oggi, il Registro Italiano SM raccoglie i dati demografici e clinici di oltre 50.000 persone seguite dai Centri clinici italiani. È dunque pronto a diventare un vero strumento di ricerca scientifica che può essere utile per lo sviluppo di studi epidemiologici e clinici e di programmazione sanitaria.

I dati del Registro Italiano Sclerosi Multipla saranno utili per promuovere l'equità di accesso alle cure confrontando le pratiche assistenziali dei diversi centri nonché studiare/valutare 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 23 progetti sulle tre aree principali della linea strategica di ricerca: 6 i progetti di epidemiologia descrittiva, 15 sull'ottimizzazione della terapia e 2 sulle forme rare di SM.

Italian Multiple Sclerosis Register

The Italian Multiple Sclerosis Register 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 MS Register, 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 140 Italian Clinical Centers have joined the project and to date, the Italian MS Register collects demographic and clinical data of over 50,000 people followed by Italian clinical centers.

Data from the Italian Multiple Sclerosis Register will be useful to promote 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 MS Register 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, pediatric MS onset, aggressive forms.

Currently 23 Projects have been active on the three main areas of the strategic research line: 6 descriptive epidemiology projects, 15 projects on the optimization of the therapy and 2 project on rare forms of the disease.

Caratterizzazione clinica ed evoluzione della sclerosi multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo



Lorena Lorefice

Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Sclerosi Multipla, Ospedale R. Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

La sclerosi multipla ad 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 pazienti. Pochi studi hanno confrontato le caratteristiche cliniche e demografiche di questi pazienti con i casi di SM ad esordio classico, riportando con maggiore frequenza un decorso progressivo primario, notoriamente associato a più severa disabilità. Le informazioni relative agli outcomes clinici di questi pazienti, alla loro capacità di rispondere ai trattamenti e alle conseguenti implicazioni prognostiche risultano comunque ancora parziali.

Il presente progetto, retrospettivo e multicentrico, nasce con l'obiettivo di colmare quest'area di incertezza attraverso la descrizione delle caratteristiche cliniche precoci e tardive dei pazienti LOMS di un'estesa coorte italiana e confrontando tali caratteristiche con quelle dei casi ad esordio in età giovane-adulta.

Lo studio sarà realizzato utilizzando i dati presenti nel registro italiano SM IMed Web. In primis, saranno identificati e valutati i pazienti con diagnosi di SM e con età all'esordio superiore ai 50 anni (LOMS). Successivamente sarà incluso un secondo gruppo di pazienti SM con esordio classico in età giovane-adulta (20-40 anni) (young-adult onset MS; YOMS). I pazienti appartenenti ai due gruppi saranno confrontati per sesso e durata di malattia.

Saranno valutate tutte le seguenti informazioni: età all'e-

sordio della SM, età alla diagnosi, primo sintomo clinico, decorso clinico (recidivante remittente o primariamente progressivo all'esordio), durata di malattia, livello di disabilità (EDSS score) al momento dell'esordio e dell'ultima valutazione clinica, il numero e il tipo di ricadute e l'uso di farmaci disease-modifying (DMDs). Inoltre, per ciascun paziente, sarà definito un "progression index" (EDSS score/anni di malattia). Per quanto riguarda le analisi statistiche, in primis sarà effettuata un'analisi descrittiva in base alla distribuzione dei dati; le caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi (LOMS vs YOMS) saranno poi confrontate. La curva di sopravvivenza sarà usata per definire il tempo dall'esordio della malattia al raggiungimento del punteggio EDSS a 3 e a 6, sia all'interno di ogni gruppo che tra i due gruppi; saranno quindi determinati i potenziali fattori di rischio associati alla progressione di malattia che contemporaneamente saranno inseriti come covariate in un modello multivariato di Cox.

L'obiettivo primario dello studio è la caratterizzazione clinica dei pazienti LOMS in modo da chiarire in un esteso campione se l'esordio tardivo è associato a outcomes clinici peggiori o se il più importante determinante per la prognosi è il decorso clinico. Lo studio mira a inoltre a incrementare le conoscenze relative ai fenotipi clinici della LOMS, alla prognosi e all'impatto che l'uso dei farmaci DMDs possono avere sull'evoluzione della malattia.

Clinical characteristics and disease outcomes of late onset multiple sclerosis: a retrospective multicenter study

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. To date, few studies compared this population with young-adult onset MS (YOMS) patients in term of demographic and clinical characteristics, some of which assessed that LOMS more frequently features a primary progressive course, predicting a severe disability, while a recent study showed that older age at MS onset is an independent factor of poor prognosis. However, there is still uncertain information about the clinical outcomes of LOMS, the response to disease modifying treatments (DMDs) and consequently the implication for disease prognosis. The present project is a multicenter retrospective study aimed to describe the early and late clinical characteristics of LOMS in a large cohort of Italian MS patients, using YOMS as a comparator. Data of the Italian IMedWeb MS Registry will be used to perform this retrospective analysis. Firstly, patients diagnosed with MS with an age at onset of > 50 years (LOMS) will be evaluated for study and following a comparison group of YOMS cases, comprising patients with an age at MS onset between 20-40 years, will be included. LOMS and YOMS cases will be matched for sex and for disease duration. Information on age at MS onset, age at MS diagnosis, initial MS presentation,

disease course (classified into either a primary progressive or relapsing course from onset), disease duration, level of disability (EDSS score) at onset and at least examination, number and type of relapses, and the use of disease modifying drugs (DMDs) will be evaluated. In addition, a progression index (EDSS score/disease duration) for each patient will be also defined. Initially, a descriptive analysis will be conducted, according to data distribution, and the demographic and clinical characteristics of the LOMS and YOMS groups were compared.

A Kaplan-Meier survival analysis will be used to estimate the time from onset to EDSS 3 and EDSS 6 within and between the LOMS and YOMS groups, and the potential risk factors associated with progression will be assessed simultaneously as covariates in a multivariate Cox regression models. The primary objective of this study is the better clinical characterization of LOMS patients in order to clarify in a large sample if late-onset is associated with a worse outcome or if the most important determinant for disease prognosis is the disease course. Furthermore, it aims to increase knowledge about the LOMS clinical phenotype and the impact that the use of DMDs may have on the number of relapses and accumulation of disability, giving new information on prognostic factors of these patients, in order to optimize their care.

Variazione delle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da SM con diagnosi tra il 1983 e il 2016



Giuseppe Fenu

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

È un'osservazione comune emergente dalla pratica clinica quotidiana e dall'osservazione delle popolazioni di pazienti inclusi negli studi, che le caratteristiche cliniche e demografiche delle persone affette da sclerosi multipla (SM) abbiano avuto una sostanziale modifica nel corso delle ultime decadi. Alla base di tale modifica vi sono probabilmente diverse componenti: l'evoluzione dei criteri diagnostici, la maggiore conoscenza e attenzione rivolte alla patologia, la maggiore disponibilità e il progresso tecnico degli strumenti di completamento diagnostico, in primo luogo degli apparecchi di risonanza magnetica nucleare (RMN). Inoltre la disponibilità di trattamenti efficaci e la dimostrazione dell'importanza dell'inizio precoce della terapia spingono ulteriormente ad arrivare alla definizione diagnostica in una fase sempre più precoce della storia di malattia. Tuttavia sono attualmente scarsi gli studi che hanno confrontato le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti che hanno ricevuto la diagnosi di SM nelle diverse decadi. Un recente studio ha osservato in una coorte di pazienti una significativa modifica della prognosi a lungo termine nei pazienti con diagnosi dopo il 2000 rispetto a quelli con diagnosi precedente, attribuendola principalmente ai cambi nei pattern di trattamento. Obiettivo del nostro studio è quello di valutare se sono

presenti differenze relativamente ai principali parametri clinici e demografici nei pazienti che hanno ricevuto la diagnosi di SM nelle diverse decadi. Per ciascun paziente verranno valutati i seguenti parametri: genere, età all'esordio, età alla diagnosi, latenza diagnostica (intervallo temporale tra esordio clinico e diagnosi), tasso di ricadute annualizzato nei primi 2 anni di malattia, tempo tra esordio e prima ricaduta, tempo dall'esordio al raggiungimento dell'EDSS 6, 0, disseminazione spaziale nella prima RMN, sistema funzionale interessato all'esordio, EDSS all'ultimo controllo, MSSS all'ultimo controllo.

I pazienti verranno poi classificati sulla base delle decadi di diagnosi:

- 1983-1995: dai criteri di Poser fino alla disponibilità dei primi immunomodulanti
- 1996-2005: dalla disponibilità dei primi immunomodulanti alla comparsa del natalizumab (con sottogruppo 1996-2000 (IFN-Criteri di McDonald) 2001-205 (Criteri di McDonald-Prima revisione dei criteri)
- 2005-2016: prima e seconda revisione dei criteri di McDonald (con sottogruppo 2005-2011: prima revisione criteri di McDonald-Seconda Revisione e 2011-2016: seconda revisione dei criteri di McDonald attuale).

Changes of clinical and demographic characteristics in patients with MS diagnosis during the various decades between 1983 and 2016

It is a common observation emerging from daily clinical practice and from analysis of multiple sclerosis (MS) populations included in clinical studies that the clinical and demographic characteristics of people with multiple sclerosis have had a substantial change over the last decades. At the basis of this change, there are probably several components: evolution of diagnostic criteria, greater knowledge and attention to pathology, greater availability and technical progress of diagnostic completion tools primarily for MRI scan. In addition, the availability of effective therapies and the demonstration of the importance of early treatment, it leads to arrive at diagnosis at an increasingly early stage of the history of the disease. However, there are currently few studies that compared the clinical and demographic characteristics of patients who have been diagnosed with MS over the decades. A recent study observed in a cohort of patients a significant change in long-term prognosis in patients with post-2000 diagnosis compared to those with previous diagnosis, primarily attributing it to changes in treatment patterns. The aim of our study is to evaluate whether differences in the main clinical and demographic parameters are present in

patients who have been diagnosed with MS over the decades.

For each patient, the following parameters will be evaluated: gender, age at onset, age at diagnosis, diagnostic latency (time interval between clinical onset and diagnosis), annualized relapse rate in the first 2 years of disease, time from onset to first relapse, time from onset to reach EDSS 6,0, spatial dissemination in the first RMN, system functional involved at onset, EDSS at last control, MSSS at last control.

Patients will then be classified on the basis of decades of diagnosis:

- 1983-1995: from the Poser criteria to the availability of the first immunomodulants
- 1996-2005: from the availability of the first immunomodulants to the onset of natalizumab (with subgroup 1996-2000 (McDonald's IFN Criteria) - 2001-2005 (McDonald's Criteria - First Criterion Revision)
- 2005-2016: First and Second Revision of McDonald's Criteria (Subgroup 2005-2011: First McDonald-Second Revision Criteria Review and 2011-2016: Second Revision of Current McDonald Criteria).

Valutazione dei fattori prognostici al basale in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla



Jessica Frau

*Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Sclerosi Multipla, Ospedale R. Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari
Centro Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Cagliari, Ospedale Binaghi, Cagliari*

La ricerca dei fattori prognostici che incidono sullo sviluppo della sclerosi multipla (SM) e sul successivo decorso ha sempre destato un grande interesse ed è ancora attuale. Nel corso del tempo, grazie anche ai miglioramenti delle tecniche diagnostiche, non solo fattori clinici e demografici, ma anche laboratoristici e di risonanza magnetica sono stati presi in considerazione come possibili modificatori della prognosi.

L'introduzione dei farmaci disease-modifying (DMDs) nella SM, avendo cambiato la storia naturale della malattia, può influire anche sui vari fattori prognostici sino ad ora trovati. Tale utilizzo precoce è essenzialmente legato a una sostanziale anticipazione nella diagnosi grazie anche all'evoluzione dei criteri diagnostici. Tali differenti approcci potrebbero aver parzialmente modificato l'impatto dei vari fattori prognostici.

Obiettivo del nostro studio è valutare in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da SM che hanno esordito con una ricaduta clinica quali fattori presenti al basale possono predire il successivo decorso della patologia, esaminando in particolare quattro variabili: il tempo tra l'esordio e la seconda ricaduta di malattia, il raggiungimento dei punteggi 3 e 6 nella scala EDSS (Expanded Disability Status Scale), il punteggio alla scala multiple sclerosis severity scale (MSSS) all'ultimo controllo. Le variabili considerate saran-

no esaminate in due differenti coorti, la prima rappresentata da pazienti diagnosticati sino al 2000 e la seconda da pazienti con diagnosi dal 2001 al 2015 per evidenziare eventuali differenze tra i 2 gruppi. La scelta di tale anno è stata posta in quanto i primi DMDs sono stati introdotti pochi anni prima del 2000 e nel 2001 sono entrati in vigore nuovi criteri diagnostici. Questo permetterà di capire se l'uso dei DMDs e il differente approccio alla malattia con possibilità di diagnosi più precoce hanno modificato i fattori prognostici basali rispetto a quanto riportato nella letteratura in epoche precedenti. Obiettivo secondario è la valutazione di differenze nei fattori prognostici generali trovati tra la Sardegna e le altre regioni italiane, considerando la netta prevalenza della malattia nell'isola e le sue peculiari caratteristiche genetiche e ambientali. Anche in questo caso le 2 coorti saranno divise ognuna in 2 gruppi, a seconda dell'anno della diagnosi (sino al 2000, dal 2001 al 2015). Per ciascun paziente verranno valutate le seguenti caratteristiche: genere, età all'esordio, anno di diagnosi, tempo tra l'esordio e la seconda ricaduta clinica, sistemi funzionali coinvolti all'esordio, eventuale età al raggiungimento dei punteggi EDSS 3 e 6, EDSS all'ultimo controllo, MSSS all'ultimo controllo, presenza o assenza di bande oligoclonali (OB) IgG nel liquor, disseminazione spaziale alla prima risonanza magnetica.

Evaluation of baseline prognostic factors in a large Italian cohort of patients with multiple sclerosis

The study of prognostic factors involved in the development and clinical course of multiple sclerosis (MS) has been and is still now of great interest. In the last decades, due to the improvement of diagnostic tools, not only clinical and demographic features, but also laboratory and radiological features have been considered as potential prognosis modifiers. To note, the introduction of DMDs in the early phase of MS, essentially due to the more precocious diagnosis due to the new diagnostic criteria, has been found to considerably impact the natural history of the disease. Thus, they could also have an effect on the historically considered prognostic factors.

The primary aim of the study is to evaluate in a large cohort of Italian MS relapsing patients the baseline prognostic factors, which can impact on the following outcomes: time to second clinical relapse, time to the achievement of the EDSS scores 3 and 6, MSSS score at the last follow-up. The analysis will be performed dividing the cohort in a group with diagnosis until 2000 and the other with diagnosis since 2001 until 2015. This cut-off

has been chosen because coincident with application of the new diagnostic criteria and because it comes just few years after the introduction of DMDs. This could permit to understand whether the use of DMDs and the more precocious diagnosis impact on prognostic factors. Secondary outcome is to evaluate possible differences in prognostic factors between Sardinian patients and the other Italian cohort. Indeed, MS has a significant higher prevalence in the island, having a peculiar genetic and environmental background. Also in this case, both the Sardinian patients and the Italian cohort will be divided in 2 groups, in respect to the year of diagnosis (until 2000, and from 2001 until 2015). For each included subject the following features will be analysed: gender, age at onset, year of diagnosis, time from the onset to second relapse, functional systems involved at the onset, age at achievement of EDSS scores 3 and 6, MSSS at last follow-up, presence of oligoclonal bands IgG in cerebrospinal fluid, spatial dissemination in the first MRI.

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



Paola Mosconi

on behalf of Scientific Committee

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano

Nella pratica clinica e nella ricerca clinica, la disabilità delle persone con sclerosi multipla viene misurata attraverso un approccio standardizzato utilizzando il sistema EDSS (Expanded Disability Status Scale). La prevenzione della disabilità e la gestione dei cambiamenti della disabilità sono obiettivi molto importanti sia per la pratica clinica sia per la ricerca clinica. Recentemente la letteratura ha suggerito che i termini “peggioramento” e “progressione” - in riferimento a variazioni della disabilità misurate con EDSS - debbano essere distinti. Con il termine “peggioramento” si descrive un aumento della disabilità dovuto a ricadute, mentre il termine “progressione” è riservato ad

un aumentare progressivo della disabilità non correlato a una recidiva. Utilizzando i dati disponibili nel database del Registro Italiano Sclerosi Multipla questo progetto mira a convalidare le analisi relative alle misure di progressione della disabilità non correlate alla ricaduta utilizzando le variazioni dell'EDSS. Come proposto nell'articolo di riferimento di Kappos et al, verranno analizzati i valori di EDSS sia facendo riferimento ai valori baseline ma anche a valori “roving (vagabondi/nomadi)” che ripristinano il punteggio di riferimento dopo una conferma di 24-48 settimane di un nuovo punteggio.

The use of a roving EDSS reference value to enhance detection of EDSS worsening events: A real world evaluation through the Italian MS Register

In clinical practice and in clinical research, MS disability is measured through a standardized approach using the Expanded Disability Status Scale (EDSS). The prevention and the management of MS disability, as measured by the EDSS, is an important goal of clinical practice and clinical research. As suggested by recent literature, when referring to increases in MS disability the terms “worsening” and “progression” need to be distinguished: the term “worsening” describes increased disability due to relapses, while the term “progression” is reserved to progressively

increasing disability unrelated to relapse activity. The use of a roving EDSS reference value should also allow more sensitive measurement of disability progression within relapse-free periods according to specific, time-based interval definitions (e.g., 24 or 48 weeks apart). This research project aims to evaluate/replicate and validate measures of disability progression unrelated to relapse using EDSS as proposed by Kappos et al, using data collected by the Italian SM Register as expression of real world setting.

Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano Sclerosi Multipla sulle forme secondariamente progressive (SMSP)



Maria Trojano

Centro SM Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari

Le forme progressive di SM sono caratterizzate clinicamente dall'accumulo di disabilità, per lo più indipendente dalle ricadute, che si verifica dall'inizio della malattia (forme primariamente progressive di SM, SMPP) o, più comunemente, dopo una fase iniziale caratterizzata da ricadute e remissione clinica (forma secondariamente progressiva, SMSP). La distinzione tra fenotipi recidivanti e progressivi può essere difficile: non esiste un biomarcatore che differenzi le due diverse entità e neppure il passaggio da un fenotipo all'altro, che è quindi evidente solo retrospettivamente (Lublin et al, Neurology, 2014). Le evidenze scientifiche suggeriscono che la neurodegenerazione, la caratteristica principale della fase progressiva, sebbene inizialmente innescata dall'infiammazione, evolva succes-

sivamente in modo indipendente e che l'infiammazione del SNC stessa, sebbene inizialmente di origine periferica, divenga autosostenuta livello centrale. Di conseguenza, le strategie terapeutiche della SM dovrebbero essere specifiche per stadio di malattia; questo nelle forme progressive significa controllare direttamente l'infiammazione intratecale, attivare meccanismi neuroprotettivi, promuovere la rimielinizzazione / riparazione del SNC (Lassmann et al., Mult Scler, 2017). Lo scopo dello studio è quello di comprendere l'epidemiologia della SMSP e le attuali strategie di trattamento per affrontare in modo adeguato le esigenze non soddisfatte, ridurre i costi e l'utilizzo di terapie inefficaci e gestire l'impatto del budget.

INTEREST: Italian Multiple Sclerosis Registry non interventional retrospective analysis in secondary progressive multiple sclerosis (SPMS)

Progressive forms of MS are characterized clinically by the accumulation of neurological disability, mostly independent of relapses and occurring from the initial disease course (primary progressive multiple sclerosis, PPMS) or more commonly following an initial relapsing phase (secondary progressive multiple sclerosis, SPMS). Distinguishing between relapsing and progressive phenotypes can be challenging: there is no biomarker differentiating the entities and the transition from relapsing to progressive phenotypes is only evident retrospectively (Lublin et al, Neurology, 2014). Evidence suggests that neurodegeneration, the main characteristic of the progressive phase,

though initially triggered by inflammation, subsequently evolves independently, and that the CNS inflammation itself, though initially peripherally driven, becomes self-sustained. Consequently, MS therapeutic strategies should be stage-specific, which for progressive disease means directly controlling intrathecal inflammation, activating neuroprotective mechanisms, promoting remyelination/CNS repair (Lassmann et al, Mult Scler, 2017). The aim of the study is to understand the epidemiology of SPMS and the current treatment practices in order to appropriately address the unmet needs, reduce cost and usage of ineffective therapies and manage the budget impact.

Validazione di un metodo per l'identificazione di casi prevalenti e incidenti di SM utilizzando differenti sorgenti di dati. Un case study in alcune province della regione Emilia-Romagna



Mario Alberto Battaglia

on behalf of Scientific Committee

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova

Negli ultimi anni, si è osservato un crescente sviluppo di metodi basati sull'utilizzo di dati amministrativi sanitari per stimare la prevalenza di malattie croniche e per valutare la qualità dei servizi sanitari. Questa tipologia di dati destano interesse, rispetto ad altri metodi, per il costo relativamente basso, per la facilità di raccolta e per il loro potenziale utilizzo ripetuto nel tempo. Tuttavia, questi dati (fonti secondarie) non sono raccolti per scopi specifici di ricerca e la loro validità deve essere valutata prima dell'utilizzo. Gli obiettivi di questo studio saranno la validazione di un algoritmo di definizione di casi di sclerosi multipla (SM) basato sull'utilizzo di molteplici fonti di dati sanitari e socioassistenziali derivanti da database amministrativi al fine di fornire stime di incidenza e prevalenza di SM. L'algoritmo sarà sviluppato attraverso l'implementazione di un case study in alcune province della regione dell'Emilia Romagna. In particolare, sarà utilizzata la banca dati dell'Agenzia Regionale della Sanità dell'Emilia-Romagna come sorgente di dati sanitari e come fonte di dati socioassistenziali il database relativo alle prestazioni so-

cioassistenziali e previdenziali INPS; i dati saranno potenzialmente disponibili a partire dal 1° gennaio 2008 al 31 dicembre 2018.

La validazione dell'algoritmo di definizione sviluppato sarà effettuata attraverso la misura del grado di sensibilità e di specificità dello stesso. In particolare, per testare la sensibilità sarà utilizzata, come gold standard, una coorte di pazienti affetti da SM estratta dal Registro Italiano SM. Per testare la specificità dell'algoritmo, sarà utilizzata una seconda coorte di individui, non SM, derivata dai dati amministrativi sanitari. Inoltre, sulla base dei risultati di uno studio di fattibilità, che sarà effettuato come step preliminare dello studio, verrà utilizzato un secondo gruppo di controllo (veri negativi) rappresentato da soggetti, non SM, possibile SM o neurite ottica estratto attraverso il Registro Italiano SM. Aspetto rilevante dello studio sarà rappresentato dalla disponibilità di dati clinici (Registro Italiano SM) che consentirà di valutare il diverso grado di accuratezza diagnostica tra dati clinici e amministrativi.

Validate a case definition of MS using different electronic (health and social) record: case study on selected provinces of Emilia-Romagna region

In recent years, there has been a growing interest in developing methods based on health administrative databases to estimate prevalence of chronic diseases and to assess quality in healthcare services. Health administrative data are attractive because of their relatively low cost, ease of use relative to other methods, and potential for repeated use over time. However, these data are not collected for research purposes, and their validity must be assessed before use. The objective of this study will be to validate a case definition of multiple sclerosis (MS) using multiple sources of health and social administrative data to provide estimates of MS incidence and prevalence for selected provinces of Emilia-Romagna region. Emilia-Romagna region Health Information Systems (HIS) will be the sources of health administrative data, while the database related to welfare and social security benefits (Istituto Nazionale della Previdenza Sociale, commonly known as INPS) will

be that one of social administrative data. We will use population-based HIS and INPS database virtually available from January 1, 2008 to December 31, 2018 to identify individuals with MS using a potential case definition. The algorithm sensitivity will test on a true-positive reference cohort of MS patients extracted from the Italian MS register. To test algorithm specificity, we will use a cohort of individuals who were presumably not affected by MS derived from the health administrative data. Besides, if a feasibility study will confirm the feasibility, we will use always to test algorithm specificity, a further reference group (true-negative) represented by subjects identified through the Italian MS Register as not affected by MS. Key point of the study will be the availability of clinical data (Italian MS Register) that will allow to evaluate the potential different degree of diagnostic accuracy between clinical and administrative data.

Valutare l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti nella sclerosi multipla progressiva



Maria Pia Amato

Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica,
Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

Il trattamento delle forme di sclerosi multipla (SM) progressiva (P) rappresenta un aspetto controverso nella letteratura e poco studiato nei RCTs. Le linee guidaECTRIMS/EAN hanno posto chiare raccomandazioni per quanto riguarda il trattamento con farmaci disease-modifying (DMDs) nelle forme recidivanti remittenti (RR), nella sindrome clinicamente isolata (CIS) e, solo come raccomandazione debole, nelle forme secondariamente e primariamente progressive (SMSP, SMPP). Diversamente, le linee guida nord Americane danno indicazione a considerare la sospensione dei DMDs dopo lo shift alla fase secondariamente progressiva. La mancanza di dati Evidence-Based in questo campo ha molteplici possibili spiegazioni: la rarità delle forme PP; la mancanza di farmaci con meccanismo d'azione che sia efficace contro la patogenesi e la neurodegenerazione delle forme progressive; la mancanza di misure di outcome sensibili e ben validate che identifichino la progressione di malattia; la diagnosi di progressione stessa che rimane clinica e confermata solo retrospettivamente. Allo stesso tempo, sono estremamente limitati anche i dati disponibili riguardo la sicurezza e tollerabilità dei DMDs nelle forme progressive. Questo aspetto assume grande rilievo in considerazione del fatto che i soggetti con SMP appartengono generalmente a fasce di età più avanzate, sono a maggior rischio di comorbidità e molti raggiungono lo stadio di SMSP dopo diversi anni di immunoterapia.

Nella pratica clinica una certa proporzione di pazienti con SMP sono trattati con DMDs di prima e seconda linea,

cosicché è possibile trarre informazioni dagli studi di real life basati sui pazienti inclusi nei Registri SM.

Lo studio si propone di fornire dati di efficacia e sicurezza dei DMDs in pazienti con PMS trattati nella pratica clinica, confrontati con pazienti con PMS non trattati. Obiettivi secondari sono il confronto tra le forme di PMS attiva e non attiva e tra i farmaci di prima e seconda linea.

Questo è uno studio multicentrico, retrospettivo, condotto su dati acquisiti prospetticamente.

I pazienti verranno suddivisi in 3 braccia di trattamento a seconda della terapia assunta durante la fase progressiva della malattia (PP o SP):

1. Pazienti in terapia con DMDs di prima linea
2. Pazienti in terapia con DMDs di seconda linea
3. Pazienti che non assumono DMDs (identificati come gruppo di riferimento o controllo).

In ogni gruppo saranno distinti i pazienti con forma attiva e non-attiva (clinicamente e sulla base della risonanza magnetica) secondo i criteri pubblicati da Lublin e Reingold. Per ridurre il rischio di bias derivante dalla mancata randomizzazione i pazienti verranno sottoposti a matching usando il propensity-score sulla base di durata di malattia, sesso, età, punteggio EDSS e terapie precedenti.

Gli endpoint di efficacia comprendono: tasso annualizzato di ricadute, Progression Index, tempo alla progressione dell'EDSS confermato a 3 mesi, tempo alla sospensione della terapia per mancata risposta. Gli endpoint di sicurezza saranno la frequenza e la severità degli eventi avversi e il tempo alla sospensione della terapia per eventi avversi.

Assessing efficacy and safety of treatments in progressive multiple sclerosis

Background. The treatment of patients affected by progressive multiple sclerosis (PMS) is controversial and these phenotypes are scarcely represented in RCTs. The European treatment guidelines give indications about the efficacy of Disease Modifying Drugs (DMDs) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis, in Clinically Isolated Syndrome (CIS) and, as weak recommendation, in primary and secondary progressive multiple sclerosis (PPMS, SPMS). Instead, the North-American guidelines recommend considering discontinuing treatment with DMDs after the shift from the RR to the SP phase of the disease. The paucity of evidence based data on treatment strategies for PMS has many potential explanations: among these, the rarity of the PP course as compared with the RR one, the lack of drug whose mechanism of action is able to tackle the specific pathogenetic mechanisms and neurodegeneration that characterises PMS, the lack of sensitive and well-validated outcome measures assessing progression; inherent difficulties in the diagnosis of progression itself that remains mainly a clinical and retrospective one. At the same time, trial data about tolerability and safety of DMDs in PMS are limited as well. This is an extremely relevant issue: in fact, patients with PMS are usually older than those with RRMS and are at higher risk of age-correlated comorbidities. Moreover, a sizeable proportion of patients shift to the SP course after many years of immune-therapy.

In clinical practice, however, a considerable number of PPMS and SPMS patients are treated with first or second line DMDs, so that some information can be derived from

the real-life population of patients included in MS registries.

The objective of the study is to provide real-life data about efficacy and safety of DMDs in PMS, compared with PMS not treated with DMDs. Secondary objectives of the present study are the comparison of results between patients with active PMS and non-active PMS and the comparison of results obtained in PMS using first and second line DMDs.

This is a multicentric, retrospective cohort study based on prospectively acquired data. Patients will be divided into 3 arms according with the treatment exposure during the PMS phase (PP or SP):

1. Patients taking first line DMDs
2. Patients taking second line DMDs
3. Patients taking no DMD (identified as reference or control group).

Furthermore, within each group patients will be classified as having active or non-active disease (clinically and/or radiologically) using the Lublin and Reingold classification. To allow for a less biased comparison patient will be propensity score-matched according to disease duration, age, sex, EDSS score and previous therapies.

The primary efficacy endpoints are the annualized relapse rate, progression Index, time to 3-month CDP on the EDSS, time to discontinuation due to non-response. The primary safety end-points are frequency and severity of adverse events and time to discontinuation due to adverse events.

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



Damiano Paolicelli

Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Policlinico di Bari, Bari

La presente proposta si configura come un ampio studio, multicentrico, osservazionale, di coorte retrospettivo, per valutare l'impatto a lungo termine di diverse strategie di trattamento sugli esiti della disabilità nei pazienti con SM recidivante remittente (SMRR) analizzando i dati del Registro italiano iMedWeb sulla sclerosi multipla (SM). Recenti evidenze mostrano la possibilità che i diversi approcci terapeutici nella SM possano avere effetti simili quando valutati a lungo termine (almeno 4 anni) sulla progressione della disabilità. In particolare, l'impatto a lungo termine di diverse sequenze di trattamento è rilevante in condizioni particolari (ad esempio, per donne che pianificano una gravidanza o per pazienti pediatrici), in cui i clinici possono avere bisogno di rinviare terapie immunosoppressive a favore di farmaci immunomodulatori (come IFN beta-1a SC) con un miglioramento del rapporto rischio/beneficio. Saranno valutati tre gruppi di pazienti affetti da SM, a partire dalla loro prima terapia: i soggetti che hanno iniziato con interferone beta-1a SC 44 mcg e poi passati a Fingolimod (FTY), come prima opzione, e rimasti in trattamento con FTY fino all'ultimo controllo clinico registrato; soggetti in trattamento con FTY, fino all'ultimo follow-up prescritto come trattamento di prima linea (il farmaco orale con il più lungo follow-up) e soggetti che hanno iniziato con IFN beta-1a SC 44 mcg e che hanno proseguito con tale terapia fino all'ultimo follow-up.

Questo è uno studio osservazionale, di coorte. Dati longitudinali verranno estratti dal Registro Italiano iMedWeb sulla SM a partire dal 1 gennaio 2010 (anno di immissione di FTY sul mercato italiano della SM) ad oggi, raccolti in modo retrospettivo. L'intervallo di tempo tra l'interruzione di IFN beta-1a 44 mcg ed il FTY sarà considerato come un periodo di wash-out. I pazienti con un wash-out > o uguale a 3 mesi non saranno inclusi nell'analisi. Per simulare una randomizzazione, gli effetti del trattamento iniziali saranno esplorati facendo corrispondere i gruppi di trattamento (IFN beta-1a 44 mcg SC o FTY) con la tecnica del Propensity Score.

Obiettivo primario dello studio è quello di valutare la percentuale di soggetti con progressione della disabilità confermata (CDP) tra le tre coorti. Verranno esaminate, per paziente, un minimo di 3 visite (inclusa la visita basale) in cui è presente un punteggio EDSS, per poter essere in grado di valutare un evento di progressione della disabilità confermato. Saranno esclusi i punteggi EDSS registrati oltre 30 giorni dopo l'inizio di una ricaduta. Obiettivi secondari: punteggio Roving per l'EDSS in cui viene valutata la variazione di EDSS con tecniche innovative; curve nel tempo dell'EDSS (dal trattamento iniziale all'ultima visita); il tasso annualizzato di ricaduta (ARR); tempo alla prima ricaduta durante il trattamento. Altri obiettivi comprendono la sicurezza a lungo termine.

Retrospective study to evaluate the long-term impact of different treatment strategies on disability outcomes in patients with relapsing multiple sclerosis. Italian iMedWeb MS Registry. RE.LO.DI.MS Study

The present proposal is a large, multicentre, observational, retrospectively acquired cohort study, to evaluate the long-term impact of different treatment strategies on disability outcomes in patients with Relapsing MS (RMS) considering data on Italian iMedWeb MS Registry. Recent findings show the possibility that different treatment approaches may have similar long-term (at least 4 years) effects on disability progression in MS. Notably, the long-term impact of different treatment sequences is particularly relevant in specific conditions (e.g., women pursuing a pregnancy or pediatric patients), in which clinicians may need to postpone immunosuppressive therapies in favor of immunomodulatory drugs (such as IFN beta1a) with an improved risk/benefit ratio. Three groups of MS relapsing (RMS) patients will be evaluated from their first therapy: RMS subjects who started with IFN beta 1a SC 44 mcg switching to FTY, as first option, in treatment with FTY until the last follow-up, compared to RMS patients in treatment with FTY until the last follow-up and prescribed as first-line treatment (the oral drug with the longer follow-up) and patients who started with IFN beta 1a SC 44 mcg in treatment with IFN beta 1a SC 44mcg until the last follow-up.

This is an observational, retrospectively acquired cohort study. Longitudinal data will be extracted from the Italian

iMedWeb MS Registry starting from 1st January 2010 (year of FTY market availability in Italy) to date, collected retrospectively. The time interval between IFN beta 1a 44 mcg cessation and switching to FTY will be considered as an untreated wash-out period. Patients with a wash-out period > or equal at 3 months will be not included in the analysis. To simulate a randomization, initial treatment effects were also explored by matching the treatment groups (IFN beta 1a 44 mcg SC or FTY) with a Propensity Score-based 1:1 matching algorithm.

Primary objective of the study is to evaluate the proportion of subjects with confirmed disability progression (CDP) between the three cohorts. A minimum of 3 visits (incl. baseline) at which an EDSS score has been recorded will be required, by definition, for a patient to be able to evaluate a confirmed disability progression event. EDSS scores recorded within 30 days after the onset of a relapse will be excluded.

Secondary objectives: Roving EDSS score in which the increase or decrease had to be separated from the last EDSS assessment by previous EDSS, the grow curves over time (from the initial treatment to last visit) of the estimated EDSS score, Annualized Relapse Rate (ARR), time to first on-treatment relapse. Additional objectives are on long term safety profile.

Definire le scelte di trattamento nella SM durante due differenti epoche: un'analisi della real life utilizzando il Registro Italiano SM



Maria Trojano

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso
Università degli Studi di Bari, Bari

Le opzioni terapeutiche per i pazienti con sclerosi multipla (SM) sono progressivamente aumentate durante gli ultimi 20 anni. Gli obiettivi dei DMT (disease modifying treatment) sono la prevenzione delle ricadute e la progressione della disabilità. Nell'Unione Europea sono a disposizione sei farmaci di prima linea e tre farmaci di seconda linea, la decisione terapeutica sia all'esordio della terapia sia in caso di risposta sub-ottimale al trattamento è dunque complessa.

L'obiettivo di questo studio è la valutazione del cambiamento dell'approccio terapeutico con l'arrivo dei nuovi farmaci orali di prima linea (teriflunomide e dimetilfumarato).

Lo studio comparerà i criteri di scelta di uno specifico trattamento nei pazienti naive e nei pazienti che cambiano terapia in due scenari diversi "l'era dei vecchi iniettabili, Old Era" e "l'era dei primi orali di prima linea, New Era".

Gli obiettivi principali di questa analisi saranno: valutare i fattori determinanti la scelta del primo nelle due ere in un grande campione di pazienti affetti da SM recidivante remittente (SMRR) italiano; valutare le strategie di modifica del trattamento dopo la sospensione del primo DMT; valutare il profilo di tollerabilità e sicurezza dei nuovi DMTs. Questa analisi retrospettiva sarà divisa in due fasi. Due coorti di pazienti con SMRR saranno valutate separatamente. Per prima verrà valutata una coorte che include

tutti i pazienti che hanno iniziato un primo trattamento o che hanno cambiato il loro DMT durante i 24 mesi che precedono la commercializzazione del primo farmaco orale di prima linea (teflunomide). Successivamente, si analizzerà una seconda coorte di pazienti che hanno iniziato un primo trattamento o che hanno cambiato dopo il loro DMT durante i 12 mesi successivi la commercializzazione del primo farmaco orale di prima linea, quando tutti i nuovi farmaci sono diventati disponibili (teriflunomide, dimetilfumarato, peg-interferone, alemtuzumab).

L'analisi principale sarà la descrizione della frequenza di distribuzione della prima scelta terapeutica nella popolazione arruolata e delle strategie sequenziali. Le caratteristiche demografiche, cliniche e di risonanza magnetica (RM) basali saranno correlate alle possibilità di scelta. L'eterogeneità tra centri SM e nelle diverse regioni geografiche nell'approccio terapeutico sarà valutata. Il test chi quadro sarà usato per valutare l'eterogeneità tra centri, un modello di regressione logistica sarà utilizzato per determinare l'associazione tra le caratteristiche basali e la scelta del trattamento. L'efficacia del trattamento DMT sarà valutata attraverso il tasso annualizzato di ricadute e dal tempo alla prima relapse dopo l'avvio o il cambio di terapia. La persistenza al trattamento sarà valutata attraverso una analisi di tempo alla sospensione. La sicurezza sarà valutata attraverso il tasso degli eventi avversi.

Profiling treatment choices in MS during two different eras: a real world assessment in the Italian MS Registry

The treatment options for subjects with multiple sclerosis (MS) have expanded dramatically during the past 20 years. The objective of these disease-modifying treatments (DMTs) is the prevention of further relapses and accumulation of disability.

In the European Union neurologists and patients can currently choose from different licensed DMTs, six first-line and three second-line DMTs, making it increasingly difficult for patients and their physicians to choose between treatments at disease onset and in case of non-response to treatment. The aim of this study is to evaluate the change in therapeutic approach with the availability of new first line oral drugs (teriflunomide and dimethyl fumarate - DMF). The study will compare the choice criteria to assign a specific DMT in naive and switching patients during the “old injectable era” and during the “first line orals and pegilations era”. The main objectives of this analysis will be: to evaluate the determinants of the first treatment choice at the time of introduction of new therapies in a large Italian relapsing-remitting MS (RRMS) population; to evaluate the switch strategies after the first DMT discontinuation; to evaluate how the treatment choice is changed after the introduction of the new oral first-line drugs; to evaluate the tolerability and safety profile of the new DMTs. This retrospective analysis will be divided into two phases and performed as follow: two cohorts of RRMS

patients will be evaluated separately. First, a retrospective cohort that includes all patients who started treatment as naive or switched their treatment during 24 months prior to the marketing of (i.e. AIFA approval date) the first oral drug first-line (teriflunomide). Second, a retrospective cohort of patients who started treatment as naive or switched treatment posterior to the marketing the first oral drug and covering an initiation or switching period of 12 months when all new drugs are available (teriflunomide, DMF, pegylated interferon, alemtuzumab).

The primary analysis will be a description by a frequency distribution of first treatment choice in the enrolled population and of switch strategies. Baseline demographic, clinical and MRI data will be correlated with the DMT choice and timing. Heterogeneity among centres and geographic regions in the therapeutic approach will be evaluated. Chi square test will be used to assess heterogeneity among centres (anonymized) and multivariate logistic regression to evaluate the association of baseline factors with treatment choice.

Efficacy of DMTs will be assessed by the annualized relapse rate (ARR) and by the time to first relapse from treatment start and from treatment switch. Persistence on treatment will be evaluated by the Time to discontinuation. Safety will assess by the evaluation of the rate of the adverse event.

Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network



Maria Trojano

*Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso,
Università degli Studi di Bari, Bari*

Il progetto denominato BMSD network è una collaborazione avviata nel 2014 tra la rete dei centri sclerosi multipla (SM) Italiani, denominata iMedWeb network, successivamente confluita in toto nel Registro italiano SM, 3 registri SM Europei (i registri Svedese, Danese e Francese) e la rete internazionale MSBase.

Obiettivo principale di questa collaborazione è quello di cercare di risolvere questioni chiave nella ricerca sulla SM e nella gestione del paziente attraverso la condivisione di dati su larga scala. Nella fase iniziale del progetto, avviata nel 2014 e conclusasi nel 2015, è stata verificata la fattibilità tecnica dello stesso.

È stato nominato uno steering committee del progetto costituito dai rappresentanti dei 5 registri: Maria Trojano per il Registro Italiano SM; Helmut Butzkueven per MSBase; Michel Clanet per l'OFSEP (Francia); Melinda Magyarai per il Registro Danese e Jan Hillert (coordinatore dello steering committee) per il registro SM Svedese. È stato inoltre

costituito un data management sub-committee, che avrà la responsabilità di gestire la fase di condivisione dei dati confluenti dai 5 registri e di analizzare i dati.

Questo gruppo di lavoro è coordinato da Pietro Iafaldano (Registro Italiano SM) e costituito dai data manager di ciascun registro: Tim Spelman (MSBase); Nils Koch-Henriksen (Registro Danese); Leszek Stawiarz (Registro Svedese); Roman Casey (OFSEP). Sono stati elaborati 3 progetti di ricerca, utili soprattutto a testare le possibilità del progetto globale.

Gli obiettivi di questi studi sono: valutare l'efficacia a lungo termine del trattamento precoce con farmaci modificanti la malattia (DMT) rispetto a quello tardivo; studiare l'impatto a lungo termine delle DMT sulla progressione della malattia clinica nei pazienti con SMRR trattati rispetto a pazienti con SMRR non trattati e per valutare l'efficacia a lungo termine comparativa delle DMT di prima linea - DMT iniettabili e azatioprina.

Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network

The project called BMSD network is a collaboration started in 2014 between the network of Italian multiple sclerosis (MS) centers, called iMedWeb network, subsequently merged into the Italian SM Register, 3 SM European registers (the Swedish, Danish and French registers) and the international MSBase network.

The main objective of this collaboration is to try to solve key issues in MS research and patient management through large-scale data sharing. In the initial phase of the project, started in 2014 and concluded in the 2015, the technical feasibility of the project was verified.

A steering committee of the project has been appointed consisting of representatives of the 5 registers: Maria Trojano for the Italian SM Registry; Helmut Butzkueven for International MSBase database; Michel Clanet for the OFSEP of France; Melinda Magyari for the Danish MS Registry and Jan Hillert (steering committee coordinator) for the Swedish MS Registry MS Registry. A data mana-

gement sub-committee was also set up, which will be responsible for managing the phase of sharing the data from the 5 registers and analyzing the data.

This working group is coordinated by Pietro Iaffaldano (Registro Italiano SM) and is made up of the data managers of each registry: Tim Spelman (MSBase); Nils Koch-Henriksen (Danish Registry); Leszek Stawiarz (Swedish Registry); Roman Casey (OFSEP).

Three research projects have been elaborated, useful above all to test the possibilities of the global project. The objectives of the studies are: to evaluate the very long-term efficacy of early versus delayed DMTs treatment; to investigate the very long-term impact of DMTs on clinical disease progression in RRMS patients DMTs treated versus untreated RRMS patients and to evaluate the comparative long-term efficacy of first line DMTs - Injectables DMTs and Azathioprine.

Studio pilota retrospettivo sugli effetti a lungo termine di Cladribina in pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente o sindrome clinicamente isolata



Francesco Patti

Centro Sclerosi Multipla AOU Policlinico Vittorio Emanuele di Catania,
Policlinico G. Rodolico, Catania

Questo studio mira a raccogliere dati sul follow-up nella pratica clinica dopo il trattamento con Cladribina, limitato a pazienti reclutati in centri italiani. I dati anonimizzati saranno raccolti in modo retrospettivo tramite iMedWeb. Il periodo di studio sarà il tempo necessario per l'estrazione di tutti i pazienti dal database. La raccolta dei dati, utilizzando il database iMed, dovrebbe durare fino a circa 3 mesi. Le fonti di informazioni saranno i dati raccolti dal database iMed. I dati verranno inseriti nel modulo elettronico di segnalazione, da parte del personale del sito. Sono previsti circa 161 soggetti (studi ORACLE 67 pazienti, CLARITY 66 pazienti, ONWARD 28 pazienti).

Le analisi di questo studio avranno due obiettivi esplorativi: in primo luogo verrà valutata la fattibilità di un grande studio retrospettivo finalizzato alla valutazione dei trattamenti post-trial e del corso di malattia in pazienti con sindrome clinicamente isolata o con sclerosi multipla re-

cidivante e remittente arruolati in studi randomizzati di efficacia. Questa valutazione sarà basata sulla valutazione complessiva della percentuale di pazienti persi per il follow-up e sulla qualità e completezza dei dati recuperati. In secondo luogo, le informazioni descrittive ottenute da questo studio sui trattamenti post-trial e sul corso della malattia saranno anche critici per la progettazione dello studio osservazionale su larga scala. Per l'endpoint primario, l'analisi del tempo per il trattamento sarà valutata mediante classica curva di sopravvivenza di Kaplan Meier. Questa valutazione sarà completata da analisi concorrenziale dei rischi, in cui le ragioni di fine trattamento saranno considerate separatamente. Le incidenze cumulative dei motivi concorrenti per il fine trattamento saranno opportunamente calcolate tenendo conto di: inizio di una nuova terapia, nessun ulteriore trattamento (dopo un anno dall'ultimo ciclo di Cladribina, morte, sconosciuto).

Retrospective pilot study on long-term Cladribine effects in patients with relapsing remitting multiple sclerosis or clinically isolated syndrome

The aim of this Italian Pilot Study is to explore the feasibility of the retrospective approach for evaluating effectiveness in subjects previously treated with Cladribine and then followed as per clinical practice. The study results can inform on feasibility and identify modifications needed in a design of a larger, ensuing hypothesis testing study, where many different European Countries will be involved. The study will be conducted as a retrospective, observational study of patients with Clinically Isolated Syndrome (CIS) or Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) treated with Cladribine as inclusions/exclusions criteria in the pivotal trials. This study aims to collect data on follow-up in clinical practice after Cladribine treatment, limited to patients recruited in Italian Centers. Data will be collected retrospectively through iMedWeb Database, which contains anonymous clinical data.

The study period will be the time required for the abstraction of database for all patients. Data collection, using iMed database, is expected to last up to approximately 3 months following Study initiation. The source of information will be data collected from iMed database. Data will be entered into the electronic case report form by site staff. Approximately 161 subjects are planned to be included. The analyses of this study will have two exploratory objectives: first, the feasibility of a large, re-

trospective study aimed at evaluating post-trial treatments and disease course in CIS/RRMS patients enrolled in randomized efficacy trials will be assessed.

This assessment will be based on the overall evaluation of the proportion of patients lost-to follow-up, and on quality and completeness of retrieved data. Second, the descriptive information obtained from this study on post-trial treatments and disease course will be valuable on its own, but will be also critical for the design of the large-scale observational study. In the analyses of the primary endpoint, Time to treatment change will be analysed by means of a classical Kaplan Meier Survival analysis, with start of a new therapy, treatment stop or death will be considered as events while survival times of patients lost to follow-up before starting a new therapy will be censored at the time of last information.

This analysis will be complemented by a competing risk analysis, in which the reasons for treatment stop will be considered separately, using the Nelson-Aalen estimator of the cause-specific cumulative hazards: the cumulative incidences of the following competing reasons for treatment stop will be computed: start of a new therapy, no further treatment (after one year since last Cladribine course, death, unknown).

Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico



Emanuele D'Amico

Centro SM, AOU Policlinico Vittorio Emanuele, Policlinico G. Rodolico, Catania

Evidenze da studi real-life sulla scelta ed efficacia della prima linea terapeutica per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (SMRR) sono poche.

Questo studio si propone di valutare l'efficacia e i profili di interruzione dei farmaci di prima scelta nel trattamento dei pazienti con SMRR di nuova diagnosi.

Questo sarà uno studio di coorte retrospettivo con raccolta di dati collezionati in modo prospettico. I centri specializzati nella cura della SM saranno invitati a partecipare

al progetto. I centri per la SM sono attivi in Italia e sono afferenti al Registro Italiano SM.

I pazienti con SMRR che hanno ricevuto diagnosi dal 1 gennaio 2010 al 31 dicembre 2015 saranno identificati e saranno considerati per entrare nello studio.

I risultati includeranno i dati inerenti il tasso annualizzato di recidive (ARR), le progressioni di disabilità confermata e di attività neuroradiologica; la persistenza al trattamento e l'interruzione della terapia per qualsiasi motivo.

Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study

Real-world studies about effectiveness of initial disease-modifying treatment (DMT) choices for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) are scarce.

This study aims to assess the effectiveness and drug discontinuation rates of new first DMT choices among patients with newly diagnosed RRMS.

This will be a retrospective cohort study used prospectively collected data. Centers specialized in MS care will be invited to join the project. The MS centers are settled in

Italy and they are recognized by the Italian MS Register. Patients with RRMS who received diagnoses from January 1st 2010 to December 31st 2015 will be identified and will be considered to enter the study.

Outcomes will include annualized relapse rate (ARR), proportions relapse free, confirmed progression free, proportions neuroradiological activity free, treatment persistence, discontinuation of therapy due to any reason.

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

Centro SM, AOU Policlinico Vittorio Emanuele, Policlinico G. Rodolico, Catania

Lo scopo principale di questo studio è quello di analizzare il fenotipo delle ricadute e il recupero dalle stesse in una popolazione di pazienti affetti da Sclerosi Multipla Recidivante Remittente (SMRR) e sottoposti a terapie diverse. Lo studio si baserà sui dati estratti dal Registro Italiano e verranno raccolti in modo retrospettivo tutti i nuovi sintomi e ricadute dopo l'inizio del primo trattamento specifico per la malattia. Verranno analizzate le informazioni sulle recidive (tipo, durata e recupero) e verrà studiato il ruolo di ciascuna terapia nel fenotipo clinico delle recidive, in particolare il ruolo delle

nuove terapie nelle caratteristiche delle ricadute e nel loro impatto sulla disabilità. Arruoleremo tutti i pazienti consecutivamente ammessi nei centri SM italiani dal primo gennaio 2010 al 31 dicembre 2018. Includeremo pazienti che presentano SM con recidivante remittente (SMRR) e che iniziano il loro primo trattamento modificante il decorso entro sei mesi dalla diagnosi. I pazienti pediatrici o quelli con SM progressiva primaria saranno esclusi. I criteri di McDonald verranno utilizzati per diagnosticare SMRR.

Exploring phenotype and recovery from relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis patients: old versus new disease-modifying therapies

The main purpose of this study is to analyze the phenotype of relapses and their recovery in a population of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and subjected to different Disease-Modifying Therapies (DMT).

The study will be based on data extracted from the Italian Registry and all-new symptoms and relapses will be retrospectively collected after the start of the first specific treatment for the disease. Information on relapses (type, duration, and recovery) will be analyzed and the role of each therapy in the clinical phenotype of relapses will be studied,

in particular, the role of new therapies in the characteristics of relapses and their impact on disability.

We will enroll all consecutively admitted patients in Italian MS centers from January 1st, 2010 to December 31st, 2018. We will include patients presenting with relapsing recurrence (RRMS) and starting their first disease modification treatment within six months after diagnosis. Pediatric patients or those with primary progressive MS will be excluded. McDonald's criteria will be used to diagnose RR-MS.

Trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento della sclerosi multipla secondariamente progressiva: studio comparativo con pazienti del Registro Italiano Sclerosi Multipla



Matilde Inglese

*Centro per lo Studio e la cura della SM e Malattie Demielinizzanti - DiNOGMI,
Ospedale Policlinico San Martino, Genova*

L'intensa immunosoppressione seguita dal trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche (aHSCT) è una procedura utilizzata per il trattamento di forme aggressive di sclerosi multipla da oltre 20 anni. Numerosi studi clinici hanno dimostrato la straordinaria capacità di aHSCT di abolire l'attività infiammatoria di malattia anche per molti anni dalla procedura, sopprimendo le ricadute cliniche di malattia e l'accumulo di nuove lesioni infiammatorie alla risonanza magnetica. Oltre al potente effetto antinfiammatorio, vi sono, inoltre, alcuni dati che suggeriscono come aHSCT possa essere in grado di prevenire, o quantomeno rallentare, l'accumulo di disabilità neurologica anche nei pazienti nella fase secondariamente progressiva di ma-

lattia. Considerando che le attuali terapie disponibili per la sclerosi multipla secondariamente progressiva (SMSP) sono quantomeno insoddisfacenti, è di estrema importanza valutare se aHSCT è in grado di rallentare l'accumulo di disabilità neurologica nella fase progressiva della malattia. Al fine di rispondere a questo fondamentale quesito, abbiamo organizzato questo studio retrospettivo multicentrico Italiano con lo scopo di confrontare l'accumulo di disabilità neurologica in pazienti con SMSP sottoposti a aHSCT in sei centri italiani e in pazienti con SMSP non sottoposti ad aHSCT riportati nel Registro Italiano Sclerosi Multipla.

Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for secondary progressive multiple sclerosis: a comparative study with matched control patients from the Italian Multiple Sclerosis Register

Following twenty years of experience, autologous hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) is now an accepted treatment for aggressive multiple sclerosis (MS). The first studies mainly focused on treatment-refractory secondary-progressive (SP) MS patients, but the evidence of the extraordinary anti-inflammatory activity of the procedure has promptly shifted the use of aHSCT to aggressive relapsing remitting MS.

However, beyond the profound effect on relapses and MRI inflammatory activity, some studies have also suggested that aHSCT could be able to prevent long-term neurological deterioration in established progressive MS patients. Indeed, recent evidence suggests that targeting

inflammation might reduce accrual of neurological disability even in progressive MS patients, as suggested by recent studies of B-cells targeted drugs and sphingosine 1-phosphate receptor modulators in SPMS. Given the paucity of available therapeutic options for SPMS, it's of fundamental importance to evaluate the long-term effect of aHSCT in preventing disability progression in SPMS. We therefore planned this retrospective multicenter observational study in order to compare disease progression between patients with SPMS who were treated with aHSCT in six Italian MS centers and matched controlled patients with SPMS reported in the Italian MS Register.

Rischi associati alla durata del wash-out nel passaggio da fingolimod a farmaci depletivi



Diana Ferraro

Centro Malattie Demielinizzanti, Clinica Neurologica dell'Università di Modena e Reggio Emilia, Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

Le decisioni riguardanti la durata del wash-out tra farmaci immunomodulanti/immunosoppressivi devono tenere conto, da un lato, del rischio di riattivazione di malattia nel caso di wash-out troppo lunghi e, dall'altro, di questioni di sicurezza in caso di wash-out troppo brevi (ad es. il rischio di leucoencefalopatia multifocale progressiva -PML- subclinica post-sospensione di natalizumab). La sequenza dei farmaci, con i loro diversi meccanismi di azione immunologici, che si possono talora sovrapporre, complicano ulteriormente il processo decisionale.

Riguardo al passaggio da natalizumab a fingolimod, diversi studi hanno mostrato che, accorciando la durata del wash-out a 8, 6 o addirittura 4 settimane, si riduce significativamente il rischio di riattivazione di malattia rispetto a periodi di wash-out più lunghi. Al contrario, sono riportati dei casi in cui, a un wash-out troppo breve tra il fingolimod

e farmaci che causano la deplezione linfocitaria B/T, quali l'alemtuzumab e il rituximab, ha fatto seguito una riattivazione di malattia, possibilmente dovuta al sequestro dei linfociti patogenici negli organi linfoidi secondari da parte del fingolimod, dove sono protetti dall'azione dei farmaci citotossici.

Analizzando i dati del Registro Italiano abbiamo l'obiettivo di:

1. stabilire il rischio di riattivazione di malattia rapportato alla durata del wash-out, in seguito a sospensione di fingolimod e inizio di un farmaco con azione citolitica sui linfociti B/T
2. stabilire la durata media di wash-out tra il fingolimod e farmaci citolitici quali alemtuzumab, rituximab, ocrelizumab e cladribine.

Risks associated with wash-out duration when switching from fingolimod to cell-depleting agents

Decisions regarding the duration of wash-out periods between disease-modifying drugs (DMD) in Multiple Sclerosis (MS) patients need to take two important issues into account: 1) the risk of disease reactivation in case of relatively long wash-out periods and 2) safety issues in case of short wash-out periods (e.g., carry-over progressive multifocal leukoencephalopathy -PML- following natalizumab discontinuation). The sequence of different DMDs with different immunological mechanisms of action, which can overlap, further complicates matters. With regard to the switch between natalizumab and fingolimod, a number of studies have reported that shortening the wash-out period between natalizumab and fingolimod to 8, 6 or even 4 weeks can significantly reduce the risk of disease reactivation observed in case of longer wash-out periods. On the contrary, there are reports on the risks of disease

reactivation following a too short wash-out period between fingolimod and B/T cell depleting drugs such as alemtuzumab and rituximab, possibly because fingolimod induces sequestration of pathogenic lymphocytes in secondary lymphoid organs where they are protected from cell-depleting agents.

By analyzing data from the Italian MS registry, we aim to:

1. assess the risk of disease activity following fingolimod discontinuation and the initiation of a B/T cell depleting agent initiation, in relation to the duration of the wash-out between the drugs
2. assess the length of the wash-out period between fingolimod discontinuation and the initiation of B/T cell depleting agents such as alemtuzumab, rituximab, ocrelizumab and cladribine.

Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real word life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano



Francesco Patti

Centro Sclerosi Multipla AOU Policlinico Vittorio Emanuele di Catania,
Policlinico G. Rodolico, Catania

I medici specialisti che si occupano di gestire il trattamento della sclerosi multipla (SM) cercano costantemente di bilanciare i rischi e benefici dei farmaci specifici per tale patologia, molti dei quali sono dotati di notevole efficacia clinica ma gravati da numerosi effetti collaterali. In particolare, il natalizumab (NTZ) ha dimostrato in diversi studi clinici di essere in grado di ridurre significativamente l'attività clinica e neuroradiologica di tale malattia, pur essendo associato a una complicanza potenzialmente fatale conseguente alla riattivazione del virus JC latente (JCV), la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML). Questo studio multicentrico retrospettivo risponde alla domanda su quale effetto clinico può avere una dilazione della frequenza di somministrazione di NTZ sulla gestione della SM. Infatti, l'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'efficacia e la sicurezza di NTZ quando viene somministrato secondo una frequenza di infusione minore rispetto ai protocolli di somministrazione standard.

Tutti i pazienti con SM recidivante-remittente idonei per lo studio saranno stratificati in quattro gruppi sulla base del programma di trattamento NTZ ricevuto: pazienti con "intervallo standard" di somministrazione che praticano l'infusione ogni 28-34 giorni; "intervallo intermedio" che comprende pazienti che sono stati infusi ogni 35-41 giorni; "intervallo prolungato" che include pazienti che effettuano l'infusione con una frequenza compresa tra 42 e

48 giorni; "intervallo molto prolungato" che comprende i pazienti che hanno una frequenza di infusione superiore a 48 giorni. I seguenti dati verranno estratti tramite software iMed: caratteristiche demografiche, dati clinici, tempo al raggiungimento dei punteggi EDSS 4.0 e 6.0; sintomi e segni all'esordio e alle visite di controllo; punteggi EDSS all'inizio e alle visite di controllo; comorbidità, numero totale di recidive, numero di recidive nell'anno prima di NTZ e durante NTZ, esposizione a farmaci immunomodulanti e/o immunosoppressori prima di NTZ, dati sul trattamento con NTZ (data di inizio NTZ, numero di dosi somministrate, motivo della sospensione: rischio PML, gravidanza, evento avverso, scelta del paziente o mancanza di efficacia del trattamento), stato JCV all'inizio di trattamento con NTZ e all'ultimo follow-up (con valore index), PML (data di esordio, sintomi all'esordio, tipo di trattamento, numero di dosi di NTZ somministrate prima dell'esordio della PML, esito, dati RM alla diagnosi PML), dati neuroradiologici. Per valutare l'incidenza delle recidive nei 4 gruppi durante il trattamento con NTZ verrà utilizzato un modello di regressione multivariata di Poisson, mentre una regressione multivariata di Cox verrà utilizzata per valutare il tempo alla prima ricaduta e il punteggio EDSS 4 e 6. Tutti i modelli verranno adattati per le seguenti covariate al baseline. Verrà quindi eseguita un'analisi con calcolo del propensity score.

Comparative effectiveness of different Natalizumab dosing schedules in real world life: a retrospective Italian multicentre study

Physicians treating patients with multiple sclerosis (MS) are consistently attempting to balance the risks and benefits of all medications available for MS treatment. In particular, natalizumab (NTZ) treatment has exhibited a substantial reduction in both clinical and radiographic evidence of disease activity in several clinical trials even though it is associated with a potentially fatal complication by reactivation of latent JC virus (JCV), progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). This retrospective multicentre study answers the question what clinical effect extended interval dosing (EID) schedules of NTZ has on managing MS. Indeed, the main objective of this study is to evaluate the effectiveness and safety of NTZ when is administered according the extended dosing strategy compared to standard scheduled administration.

All relapsing-remitting MS patients eligible for the study will be stratified into four groups based on NTZ treatment schedule received: standard interval dosing (SID) including patients who received infusions on average every 28-34 days; intermediate late extended dosing (ILED) including patients who have been infused on a schedule every 35 -41 days; late extended dosing (LED) including patients infused on a schedule every 42-48 days; very late extended dosing (VLED) including patients infused on a schedule higher than 48 days. We will collect using iMed

software the following data: demographic characteristics, clinical data about MS (time to reach EDSS 4.0 and 6.0, symptoms and signs at onset and at follow-up visits, EDSS scores at onset and at last visit, comorbidity, total number of relapses, number of relapses in the year before NTZ and during NTZ, immunomodulant exposure prior to NTZ, immunosuppressive exposure prior to NTZ); NTZ treatment data (start date NTZ, number of doses administered, reason of discontinuation: progressive multifocal leukoencephalopathy concern, pregnancy, adverse event, patient's choice or lack of efficacy of the natalizumab treatment), JCV status at NTZ treatment onset and at last follow-up, PML (date of onset, symptoms at onset, type of treatment, number of NTZ administered before onset of PML, outcome, MRI data at PML diagnosis), MRI data at diagnosis and at follow-up visits. A multivariate Poisson regression model accounting for overdispersion will be used to assess incidence of relapses in the 4 groups during NTZ treatment, whereas multivariate Cox proportional hazards regression was used to model the time to reach the 1st relapse and EDSS score 4 and 6. All the models will be adjusted for the baseline covariates. Furthermore, to allow for an unbiased comparison, these patients will be propensity score-matched on a one-to-one basis.

Il concetto di persistenza nel miglioramento di disabilità: un'applicazione del modello di Markov ai pazienti trattati del Registro Italiano



Matilde Inglese

*Centro per lo Studio e la cura della Sclerosi Multipla e Malattie Demyelinizzanti, DiNOGMI,
Ospedale Policlinico San Martino, Genova*

Il concetto di miglioramento di disabilità sulla scala EDSS in seguito al trattamento ricevuto è stato recentemente introdotto nella sclerosi multipla (SM) per gli studi condotti su pazienti trattati con terapie altamente efficaci. Diversi trattamenti hanno mostrato non solo un effetto nel ridurre il rischio di progressione di EDSS, ma sono risultati efficaci nell'indurre un miglioramento sulla stessa scala. Recentemente, uno studio prospettico, condotto su circa 5.000 pazienti con sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR), trattati con Natalizumab, ha evidenziato una regressione media di EDSS fino a 5 anni di follow-up e la probabilità di miglioramento di EDSS (27% a 5 anni) è risultata più alta del tasso di progressione (14% a 5 anni). Altri studi osservazionali hanno confrontato, tra gli altri, la probabilità di miglioramento sull'EDSS in pazienti trattati con natalizumab vs Fingolimod. Entrambi gli studi hanno riportato una differenza significativa tra i due trattamenti in favore di natalizumab con un tasso più elevato di miglioramento di EDSS sostenuto nel tempo. Un'importante punto non ancora approfondito nell'esaminare la probabilità di miglioramento su scala EDSS è relativo al tempo totale nel quale il paziente mantiene il miglioramento raggiunto quando confrontato con i livelli di EDSS pre-trattamento.

Il principale obiettivo di questo progetto di ricerca è di sviluppare i metodi statistici opportuni per quantificare e testare l'insorgenza e la persistenza di un miglioramento di EDSS, usando i dati da una coorte di pazienti trattati con Natalizumab estratti dal Registro Italiano. Verrà selezionato un gruppo di controllo di pazienti trattati con Fingolimod per settare un test d'ipotesi che valuti se la persistenza di miglioramento è significativamente differente tra i due gruppi. La scelta di sviluppare questa metodologia sui pazienti trattati con natalizumab è basata su dati precedenti che hanno mostrato come questo trattamento sia in grado di indurre un miglioramento nei pazienti con SM. Nella prima fase tutti i pazienti con SMRR di età ≥ 18 anni inclusi nel Registro e trattati con natalizumab o fingolimod saranno estratti. Verranno utilizzate tutte le caratteristiche demografiche e cliniche (età, sesso, EDSS, durata di malattia, relapse pre-trattamento, precedente terapia) presenti nel dataset minimo del Registro.

Nella seconda fase, i dati saranno analizzati per mezzo dei modelli di Markov usando Stata e R. Il risultato atteso è lo sviluppo di una statistica per quantificare la prevalenza dei pazienti migliorati nel tempo, la determinazione dei suoi intervalli di confidenza e un test statistico per confrontare questa prevalenza tra i gruppi a confronto.

The concept of persistence in disability improvement: an application of Markov model to treated patients from the Italian Registry

The concept of EDSS improvement due to a treatment has been recently introduced in MS studies for patients treated with highly effective therapies. Some drugs showed not only an effect in reducing the risk of EDSS progression, but resulted able to induce an EDSS improvement. Recently, a prospective study conducted on about 5,000 RRMS patients treated with Natalizumab, revealed a mean regression of EDSS up to 5 years of follow-up and the probability of EDSS improvement (27% at 5 years) was higher than the progression rate (14% at 5 years). Other real world studies, compared, among other outcomes, the probability of EDSS improvement in patients treated with Natalizumab vs Fingolimod. Both studies reported a significant difference between the two treatments in favour of Natalizumab with a higher sustained rate of EDSS improvement. An important issue not addressed when examining the probability of EDSS improvement is how long the patient maintains the improvement status as compared with pre-treatment EDSS levels. The main aim of this research project is to develop statistical methods to quantify and test the insurgence and

the persistence of EDSS improvement, using data from a cohort of patients treated with Natalizumab extracted by the Italian Registry. We will select a control group of patients treated with Fingolimod to set up a hypothesis test assessing whether the persistence of improvement is significantly different between two groups.

The choice of developing this methodology on Natalizumab treated patients is based on previous data showing that this treatment is able to induce an improvement in MS patients. In the first phase all RRMS of age >18 years included in the Registry and who are treated with Natalizumab or Fingolimod will be extracted. All demographic and clinical characteristics (Age, EDSS, disease duration, relapse status pre-treatment) present in the minimum dataset of the registry will be used. In the second phase, data will be analysed by mean of Markov models using Stata and R. The expected result is the development of a statistic to quantify the prevalence of improved patients over time, the quantification of its confidence intervals and a statistical test to compare this prevalence curve between groups.

Predire precocemente l'evoluzione sfavorevole dei pazienti con Sindrome Clinicamente Isolata (CIS). Lo studio RECIS (Risk Estimate for CIS)



Roberto Bergamaschi

Centro SM, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino, Pavia

Questo progetto multicentrico mira a definire modelli prognostici per la previsione di perdere lo stato NEDA (No Evidence of Disease Activity) nei pazienti con sindrome clinicamente isolata CIS, attraverso l'analisi di un ampio set di variabili cliniche e strumentali (risonanza magnetica, potenziali evocati, liquido cerebrospinale) raccolti in pazienti affetti da CIS. Vogliamo includere nell'analisi i dati di 357 pazienti provenienti da 4 centri SM (Bari 110, Firenze 103, Gallarate 48, Pavia 96) selezionati sulla base dei seguenti criteri: sindrome clinicamente isolata; prima valutazione neurologica entro tre mesi dall'esordio; primo esame RM suggestivo di SM entro un mese dalla prima valutazione neurologica.

Al fine di definire i modelli prognostici per la perdita dello stato NEDA nei pazienti con CIS, caratterizzeremo tutti

i pazienti arruolati sulla base della loro diversa "propensione" per raggiungere l'endpoint sfavorevole, adattando modelli predittivi basati su approcci bayesiani. Abbiamo utilizzato un modello multiteminale multiplo e un approccio teorico informativo per analizzare preliminarmente le registrazioni di 76 pazienti al fine di ottenere un modello prognostico per il rischio di perdere lo stato di NEDA. I pazienti che hanno perso NEDA erano 59 (77%): 31 a 6 mesi, 14 a 12 e 14 a 24 mesi. Stiamo continuando ad analizzare tutti i dati raccolti dai 357 pazienti e sviluppare il miglior modello prognostico, confrontando approcci bayesiani e frequentisti. Inoltre ci proponiamo di creare un punteggio prognostico personalizzato e di validare il modello e il punteggio prognostico individuale su set di dati diversi.

Early prediction of unfavorable evolution of Clinically Isolated Syndrome (CIS) patients. RECIS (Risk Estimate for CIS) study

This multicenter project aims to define prognostic models for the prediction of losing NEDA status in CIS patients, through the analysis of a large set of clinical and instrumental variables (MRI, evoked potentials, cerebrospinal fluid) collected in CIS patients.

We include in the analysis the records of 357 patients from 4 MS Center (Bari 110; Firenze 103; Gallarate 48; Pavia 96) selected on the basis of the following criteria: clinically isolated syndrome; first neurological evaluation within three months from onset; first MRI examination suggestive for MS within one months from first neurological evaluation.

In order to define prognostic models for the prediction of losing NEDA status in CIS patients, we will characterize all

the patients enrolled on the basis of their different “propensity” to reach the unfavourable end-point, by fitting predictive models based on frequentist and on Bayesian approaches. We used a multiple multinomial logit model and an information theoretical approach to preliminary analyze the records of 76 patients in order to obtain a prognostic model for the risk of losing NEDA status. Patients losing NEDA were 59 (77%): 31 at 6 months, 14 at 12, and 14 at 24 months. We are in process to analyze all the collected records (357 patients); develop the best prognostic model, comparing Bayesian and frequentist approaches; setting up of a personalized prognostic score and validate of the prognostic model and of the individual prognostic score on different data set.

Analisi del Registro Italiano di Sclerosi Multipla per studiare il concetto di progressione indipendente dalle ricadute



Maria Trojano

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari

La sclerosi multipla (SM) è una patologia caratterizzata da ricadute cliniche, tuttavia evidenze scientifiche sottolineano che è presente una progressione della malattia indipendente dalle ricadute, che si può osservare anche in pazienti in trattamento. Questo studio ha come obiettivo la valutazione in un con-

testo di pratica clinica reale del tasso di progressione della disabilità e la descrizione dei fattori associati alla progressione della disabilità indipendente dalle ricadute.

Lo studio verrà condotto mediante estrazione e analisi dei dati presenti nel Registro Italiano SM raccolti dalla sua istituzione all'anno 2017.

INSPIRA - Italian analysis of the National multiple sclerosis registry studying the concept of Progression Independent from Relapse Activity

Multiple Sclerosis (MS) is a disease characterized by clinical relapses, however scientific evidences underline the presence of a disease progression independent from relapses, which could occur also in patients under treatment.

The present study aims at evaluating the rate over time

of disability progression and the factors associated to the disability progression unrelated to relapse in a real world setting.

The study foresees the extraction and analysis of data collected within the Italian MS Register from its constitution to 2017.

Confronto tra due diversi algoritmi di trattamento nella sclerosi multipla recidivante: approccio aggressivo sin dall'esordio in confronto al classico schema sequenziale



Maria Trojano

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari

Farmaci modificanti il decorso della malattia (DMTs) altamente efficaci per la sclerosi multipla, come natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone o fingolimod, presentano una efficacia superiore ai cosiddetti farmaci di prima linea (es. l'interferone beta) sui parametri di attività di malattia. Ad oggi, l'algoritmo di trattamento più frequentemente utilizzato è basato sulla strategia di escalation. Si inizia il trattamento con dei farmaci di prima linea (interferon β , glatiramer acetato, teriflunomide or dimetilfumarato) e si passa a un farmaco a maggiore efficacia nei pazienti che nonostante il trattamento manifestino riacutizzazioni o progressione della disabilità. Ad oggi non è noto se i pazienti che iniziano la terapia con un farmaco ad alta efficacia abbiano dei vantaggi a lungo termine sulla disabilità in confronto ai pazienti che iniziano con un trattamento di prima linea. Dati provenienti da confronti indiretti a partire dalle fasi di estensione

e analisi per sottogruppi dei trial clinici suggeriscono che le terapie ad alta efficacia siano associate a un miglior controllo dell'attività clinica (effetto sulle riacutizzazioni) quando iniziate precocemente rispetto all'esordio della malattia. Tuttavia, il rapporto tra il corretto timing della terapia e la sua efficacia rispetto agli outcome di disabilità non è ancora stato chiarito.

Utilizzando la coorte globale del Registro Italiano Sclerosi Multipla, noi valuteremo l'efficacia comparativa rispetto al tasso di ricadute e ad outcome di disabilità in pazienti che sono stati trattati con uno dei 4 farmaci ad alta efficacia (natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone, fingolimod) come primo farmaco e in pazienti che hanno iniziato la loro storia terapeutica con un farmaco di prima linea (interferon β , glatiramer acetato, teriflunomide or dimetilfumarato).

Early-aggressive treatment algorithm versus classical escalation therapy in relapsing multiple sclerosis

Higher-efficacy disease modifying therapies (DMTs) for multiple sclerosis (MS), such as natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone or fingolimod, have a consistently superior effect on disease activity than firstline MS therapies, such as interferon β .

To date, the most applied treatment algorithm is based on the escalation strategy, initiating treatment with one of the registered first-line DMTs (interferon β , glatiramer acetate, teriflunomide or dimethylfumarate) and escalating to a higher-efficacy agent in patients who experience on-treatment relapses or progression of disability.

Whether patients initiating higher-efficacy DMTs as their first therapy derive a greater benefit from treatment than those who start with the first-line agents, remains a mat-

ter of debate. Indirect comparisons from extension arms and subgroup analyses of randomized trials suggest that higher-efficacy therapies are associated with improved control of relapse activity when initiated earlier after MS onset. However, the effect of timing on the effectiveness of therapies on disability outcomes is still to be clarified. Using the global Italian Multiple Sclerosis Registry cohort, we will evaluate the comparative efficacy on relapse and disability outcomes in patients who commenced one of four higher-efficacy DMTs (natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone, fingolimod) as their first treatment and in patients who started their treatment history with the first-line agents (interferon β , glatiramer acetate, teriflunomide or dimethylfumarate).

Fattori predittivi di progressione di disabilità in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla



Marzia Romeo

Centro Sclerosi Multipla, Ospedale San Raffaele, Milano

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale ed è la causa più comune, non traumatica, di disabilità nei giovani adulti. La maggior parte dei pazienti presenta, nella fase iniziale della malattia, un andamento caratterizzato da episodi acuti di peggioramento clinico, definiti ricadute o esacerbazioni, seguiti da una fase di remissione della malattia. La fase secondariamente progressiva di malattia (SP) segue la fase a ricadute e remissioni dopo un tempo variabile dall'esordio di malattia ed è caratterizzata da progressivo accumulo della disabilità senza remissione. Una percentuale minore di pazienti (10-15%) presenta, invece, un decorso progressivo sin dall'esordio della malattia in assenza di episodi clinici acuti. Questa forma di malattia è definita sclerosi multipla primariamente progressiva (SM-PP).

Nella pratica clinica quotidiana l'identificazione del cambio di decorso di malattia avviene spesso in ritardo. Il ritardo nella diagnosi è anche imputabile all'assenza di marcatori di laboratorio o test specifici per la diagnosi di SM-SP e all'assenza di chiari predittori clinici di progressione di

disabilità. La diagnosi precoce permetterebbe di introdurre nella breve finestra di opportunità d'intervento (la fase di transizione verso un decorso progressivo) farmaci con potenziale effetto neuro-protettivo. L'ocrelizumab e il siponimod (BAF312) sono i primi farmaci a essersi dimostrati efficaci nelle forme progressive di malattia.

Recentemente dalla collaborazione tra la FISM e l'Università di Bari è nato il Registro Italiano SM che raccoglie gran parte dei pazienti provenienti dai vari centri SM italiani. Lo studio di quest'ampia popolazione di pazienti permetterebbe di individuare le variabili demografiche, cliniche e neuroradiologiche che identificano precocemente l'evoluzione progressiva della malattia in modo da poter intervenire precocemente, anche in questi pazienti, con terapie efficaci sul decorso progressivo di malattia. Il trattamento precoce nei pazienti con variabili predittive sfavorevoli di andamento progressivo di malattia permetterebbe di rallentare il processo degenerativo con conseguente riduzione del danno irreversibile e della spesa sanitaria associata all'elevata disabilità nella SM.

Predictive factors of disability progression in a large cohort of Italian multiple sclerosis patients

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common cause of neurological disability in young adults globally. It is a chronic degenerative illness and therefore carries a high economic and quality of life burden associated with it. One of the principal objectives in the care of people with MS is, therefore, to reduce the irreversible accumulation of neurological disability. The diagnosis of progressive MS is clinical and retrospective because based on the patient's history and the neurological exam. In everyday clinical practice, the identification of the change in disease course is often late and there are no applicable predictors of disability progression. Therefore, the objective of the present study is to identify the predictive factors of disability progression in patients with progressive course of MS included in the datasets of the Italian MS Registry. The population of the Italian MS Registry is representative of

MS population of our Country and includes a large number of patients.

This is a retrospective longitudinal study enrolling patients with secondary progressive MS (SP-MS), primary progressive MS (PP-MS) and relapsing-remitting MS (RR-MS) with Expanded Disability Status Scale (EDSS) > 4.0 and without disease activity (clinical and MRI) in the previous 6 months. A 2-year follow-up is required. The outcome of the three groups of patients, defined as disability progression sustained for at least 6 months and confirmed at the end of the 2 years' follow-up, will be compared in order to identify demographic, clinical and brain MRI variables predictive of disability progression. The early identification of patients with unfavorable predictive variables will allow treating patients with the new coming soon therapies for MS (ocrelizumab and siponimod).

E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort



Maria Pia Amato

Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

Questo studio multicentrico si propone di identificare un'ampia corte di pazienti italiani, rappresentativi della popolazione generale dei pazienti con sclerosi multipla (SM), seguiti prospetticamente nel tempo a partire dal primo episodio clinico suggestivo di SM, in modo standardizzato. Tale corte, una volta identificata, potrà arricchirsi di nuovi pazienti e rappresentare il riferimento per proposte di studi osservazionali su larga scala i cui obiettivi saranno di volta in volta proposti dai ricercatori dei Centri SM italiani.

Scopo di questo primo progetto è valutare, in questa corte di pazienti, se e in che misura varino gli indicatori prognostici di malattia all'esordio (compresa l'esposizione a farmaci modificanti il decorso) in tre sottogruppi di pazienti suddivisi in base all'età di esordio dei sintomi: Pediatric Onset Multiple Sclerosis (POMS, età d'esordio = 18 anni), Adult Onset Multiple Sclerosis (AOMS, età d'esordio "classica" tra 18 e 49 anni compiuti) e Late Onset Multiple Sclerosis (LOMS, età d'esordio = 50 anni). Gli outcome clinici che verranno presi in considerazione sono:

- a) il tempo alla conversione da sindrome clinicamente isolata (CIS) a SM clinicamente definita (SMCD) o l'intervallo di tempo tra il I e il II episodio di SM (se il paziente soddisfa già al primo episodio i criteri diagnostici per SM)
- b) il tempo al primo peggioramento della disabilità confermato a 3 mesi.

I singoli indicatori prognostici saranno distinti in predittori a basso, medio ed alto impatto prognostico sulla base dei risultati dell'analisi statistica. Sarà anche analizzata la risposta e tollerabilità ai Disease Modifying Drugs (DMDs) nei tre sottogruppi.

Questo è uno studio di corte retrospettivo, eseguito su dati acquisiti prospetticamente, multicentrico (studio di tipo 1) su pazienti seguiti fin dal primo episodio clinico suggestivo di SM a partire dal 1° gennaio 2008 (inclusi nel registro da non oltre 10 anni). Verranno analizzati come possibili predittori prognostici all'esordio il sesso, l'età all'esordio categorizzata in 3 gruppi (POMS, AOMS e LOMS), il tipo di decorso (primariamente progressivo o recidivante remittente), la familiarità per SM (parente di I o II grado), le comorbidità, il numero e il tipo di sistema funzionale coinvolto, la topografia del I episodio clinico (Neurite Ottica isolata, sindrome spinale isolata, sindrome sopratentoriale isolata - incluso un esordio ADEM-like - sindrome isolata del troncoencefalo; multifocale se l'esordio coinvolge più di due di queste sindromi topografiche), il carico lesionale alla Risonanza Magnetica, la presenza di sintesi intratecale di IgG all'esame del liquor, l'esposizione e il tipo di terapie modificanti il decorso di malattia (DMDs di I o II linea), la latenza tra l'esordio clinico della malattia e l'introduzione di una prima DMD.

E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort

This multicentric project aims to identify a cohort of Italian MS patients presenting with a first clinical episode suggestive for MS and prospectively follow them in a standardized manner. This cohort will constitute a meeting point for all the MS Italian centres for study proposals, especially large observational studies with various objectives. The aim of this first project is to evaluate if and how the prognostic indicators vary in 3 subgroups of patients with different age at onset: Pediatric Onset Multiple Sclerosis (POMS, age at onset = 18 years), Adult Onset Multiple Sclerosis (AOMS, age at onset from 18 and 49 years) and Late Onset Multiple Sclerosis (LOMS, age at onset = 50 years). The outcomes of the study will be:

- a) time to conversion from clinically isolated syndrome (CIS) to clinically defined MS (CDMS) or from the I to the II clinical episode (for those who fulfil the McDonald's 2010 criteria from the first episode);
 - b) time to a first confirmed EDSS worsening at 3 months.
- The single prognostic indicators will be distinguished in high, medium and low risk predictors on the basis of the data obtained from the statistical analysis.

Methods. This is a multicentric, retrospective study based on prospectively acquired data (type 1 study) on patients followed from their first clinical episode from January 1st, 2008.

Possible predictors that will be analysed are: age at onset (POMS, AOMS, LOMS), sex, disease course (primary progressive or relapsing remitting), familiarity for MS (first or second degree relatives), comorbidities, number/type of functional system involved, topography of first clinical episode (monofocal if the clinical presentation is with an Isolated Optic Neuritis, Isolated Spinal Syndrome, Isolated Supratentorial Syndrome -ADEM-like onset included- or Isolated brainstem Syndrome; will be termed multifocal if two or more of the abovementioned systems are involved), number of lesions at MRI scan, presence of intrathecal Oligoclonal Bands (OB) at the Cerebrospinal Fluid (CSF), the exposition and type of Disease Modifying Drugs (first - or second - line DMDs) and time to a first DMD. Furthermore, the tolerability, safeness and response to the first DMD in term of safeness and efficacy will be analysed.

Valutare il decorso clinico della sclerosi multipla a esordio pediatrico in ere differenti di trattamento: stiamo davvero modificando la malattia?



Damiano Baroncini

Centro SM di Gallarate, ASST della Valle Olona, Busto Arsizio, Varese

La sclerosi multipla (SM) a esordio pediatrico (POSM) interessa circa il 3-10% di tutti i soggetti con SM. Rispetto agli adulti, la grande maggioranza dei pazienti presenta una maggiore attività di malattia, ma anche una maggiore capacità di recupero in quanto raggiungono una disabilità lieve/severa dopo un periodo di tempo più lungo nonostante il più alto tasso di recidive. Tuttavia, ciò non significa che la POSM abbia una prognosi migliore, in quanto una disabilità moderata/severa è raggiunta a un'età inferiore rispetto alla SM a esordio in età adulta. Per questo motivo, le linee guida suggeriscono di iniziare i trattamenti modificanti la malattia (DMTs) il prima possibile. I dati sul trattamento dei pazienti con POSM provengono da piccoli studi osservazionali con brevi follow-up, i quali hanno evidenziato una sicurezza ed efficacia simili rispetto agli adulti. Recentemente, uno studio ha dimostrato che l'esposizione ai DMTs era protettiva contro il peggioramento

della disabilità nei pazienti pediatrici con un evento demielinizzante isolato. È stato dimostrato inoltre che l'esito clinico è migliorato iniziando precocemente una terapia, soprattutto se si utilizzano farmaci di più alta efficacia, e che l'effetto dei DMTs potrebbe essere più pronunciato in soggetti con trattati prima dei 12 anni di età. Questi risultati suggeriscono che la prognosi a lungo termine, in particolare l'accumulo di disabilità, dovrebbe essersi positivamente modificata dopo l'introduzione dei DMTs. Tuttavia, non ci sono dati oggettivi e a lungo termine per confermare questa ipotesi. Lo scopo di questo studio è di utilizzare la coorte del Registro Italiano Sclerosi Multipla Italiana per valutare se il decorso clinico dei pazienti POSM è stato significativamente modificato dopo l'introduzione di DMTs nella pratica clinica. Inoltre, cercheremo di identificare alcuni predittori precoci dell'accumulo di disabilità in questa popolazione.

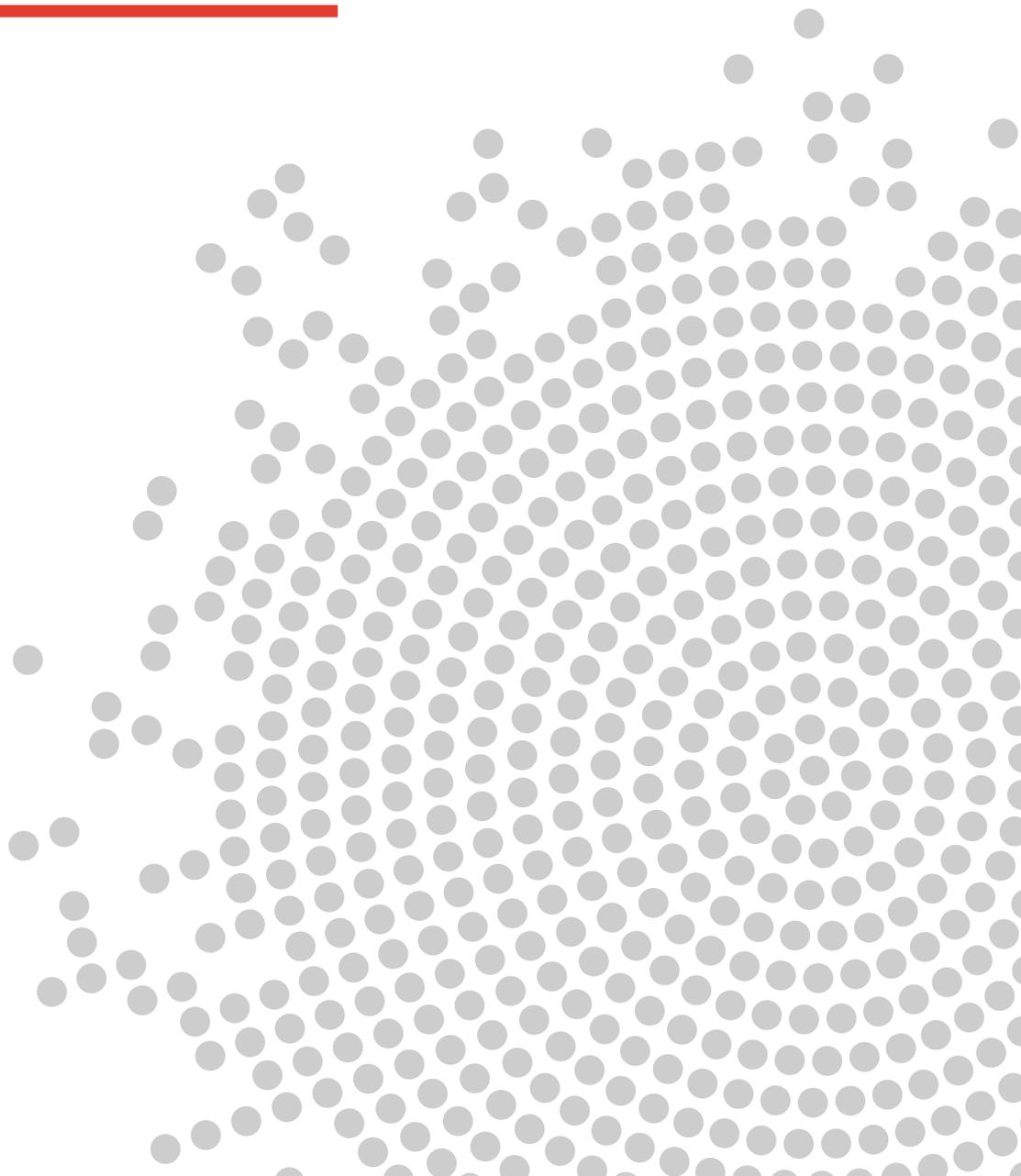
Assessing the clinical course of pediatric onset multiple sclerosis in different treatment eras: are we really modifying the disease?

Pediatric onset multiple sclerosis (POMS) is currently reported in about 3–10% of all MS subjects. Compared to adults, the large majority of patients present a higher disease activity, but also a greater capability of recovery as they reach mild and severe disability after a longer time, in spite of the higher relapse rate. However, this does not mean that POMS has a better prognosis as mild and severe disability is reached at a lower age. For these reasons, guidelines suggest to start disease modifying treatments (DMTs) as soon as possible. DMTs in POMS have been evaluated in small, short-term observational studies showing a similar safety and efficacy compared to adults. Recently, one study showed that DMTs exposure delayed disability worsening in pediatric patients with an isolated demyeli-

nating event. It has been shown that the clinical outcome is better starting earlier and using more effective drugs and that the effect of DMTs could be more pronounced in subject treated before 12 years of age. These results suggest that long-term prognosis, in particular disability accumulation, should have been positively changed after the introduction of DMTs. However, there are no objective and long-term data to confirm this hypothesis. The aim of this study is to evaluate if clinical course of POMS patients has been significantly modified after the introduction of DMTs in clinical practice, in a large cohort of MS patients. Moreover, we will try to identify some early predictors of disability accumulation in this population.

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



Massimo Filippi

Neuroimaging Research Unit, University "Vita-Salute" San Raffaele, Milano

LISTA DEI CENTRI PARTECIPANTI COINVOLTI NEL PROGETTO/ LIST OF THE
PARTECIPANTS CENTER INVOLVED IN THE PROJECT

Neuroimaging Research Unit, University "Vita-Salute" San Raffaele, Milano

Department of Neurology and Psychiatry, Sapienza University, Roma

*Department of Medical, Surgical, Neurological, Metabolic and Aging Sciences
& MRI Research Center SUN-FISM, Napoli*

*University of Campania "L. Vanvitelli", Dept. Medicine, Surgery and Neurosciences
University of Siena, Siena*

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 1.996 soggetti di cui 1.340 persone con SM e 656 controlli sani. 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 il primo triennio, INNI agirà su tre diverse linee strategiche di azione:

1. Manutenzione ed 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.

Durante il primo anno di finanziamento, sono state portate avanti le linee strategiche 1 e 2, mentre le attività della terza linea strategica saranno svolte nelle fasi successive dell'iniziativa.

The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to optimize the use of advanced MRI techniques in patients with MS

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 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.

To date 1996 subjects have been uploaded in the INNI database: 656 healthy controls and 1340 patients with MS.

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 (Action1);
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).

During the first year of funding, several steps have been performed to realize Actions 1 and 2, while Action 3 will be carried out in later phases of the initiative.

PROGETTI DI RICERCA / RESEARCH PROJECTS

Per quanto riguarda la seconda linea strategica sullo sviluppo di progetti di ricerca ad hoc, sono stati pianificati quattro diversi progetti di ricerca gestiti dai quattro centri partecipanti.

Regarding action 2 on the development of ad-hoc research projects, four different research projects were planned by the four participating centers.

Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica



Massimo Filippi

Unità di ricerca in Neuroimaging, Università "Vita-Salute" San Raffaele, Milano

Arrestare la neurodegenerazione e promuovere la neuroprotezione nella sclerosi multipla (SM) è uno degli obiettivi più importanti delle attuali strategie terapeutiche. 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. Usando la risonanza magnetica, è stato dimostrato che l'atrofia della sostanza grigia (GM) è più rilevante dell'atrofia del cervello intero o della sostanza bianca (WM) nello spiegare la disabilità clinica e il deterioramento cognitivo nella SM. Anche il talamo si è rivelato una struttura di particolare interesse: numerosi studi hanno dimostrato una riduzione del volume del talamo non solo in tutti i fenotipi clinici della SM, ma anche nelle prime fasi della malattia. Pertanto, è necessario migliorare le tecniche di analisi delle immagini in modo che l'atrofia del cervello intero, della sostanza grigia e talamica possano essere attendibilmente stimate come utili in ambito clinico per aiutare nelle decisioni di trattamento individualizzate. È importante sottolineare che i risultati derivati da ampi set di dati di persone con SM e controlli sani che utilizzano queste tecniche potrebbero essere facilmente tradotti 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 primo anno di attività sono state raccolte, dal database di INNI, le acquisizioni di immagini RM di 471 pazienti con SM e 122 controlli sani, incluse scansioni pesate in T1 e T2 ad alta risoluzione 3D. Le scansioni RM sono state tutte acquisite utilizzando lo scanner 3.0T. Poiché i metodi per la misurazione dell'atrofia della risonanza magnetica sono notevolmente influenzati dalla qualità dei dati, la prima fase del progetto ha incluso una procedura standardizzata di controllo di qualità che ha aiutato a selezionare i dati da includere in questo progetto. Abbiamo poi selezionato il software per confrontare la quantificazione dell'atrofia dell'intero cervello e della sostanza grigia. Le fasi successive comprenderanno l'applicazione della pipeline di atrofia selezionate, in base ai criteri precedentemente descritti, sull'insieme di dati collezionati (sia in sezione trasversale che longitudinale) e verranno forniti i risultati su questi confronti. Successivamente, verranno definite le anomalie morfometriche nei pazienti con sclerosi multipla e le traiettorie longitudinali della loro progressione. Infine, ci concentreremo sul confronto tra i metodi di segmentazione automatica della struttura talamica. Sulla base dei risultati ottenuti, saranno fornite le linee guida suggerite sull'acquisizione e l'analisi RM per una quantificazione affidabile dell'atrofia del cervello totale, della sostanza grigia e talamica nella SM.

Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice

Halting neurodegeneration and promoting neuroprotection in MS is one of the most important goals of current therapeutic strategies. MRI measurements of atrophy and its progression over time are among the best-studied and accepted methods for quantifying neurodegeneration. Using MRI, it has been demonstrated that gray matter (GM) atrophy is more relevant than whole-brain or white matter (WM) atrophy in explaining clinical disability and cognitive impairment in MS. The thalamus, also, proved to be a structure of particular interest: several studies showed a volume reduction of the thalamus not only in all clinical MS phenotypes, but also in the early phases of the disease. Therefore, there is a need to improve image analysis techniques in order that whole-brain, 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 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 first year of the project MRI acquisitions of 471 MS patients and 122 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. Since the methods for atrophy measurements on MRI are considerably affected by the quality of the data, the first phase of the project included the quality review of MRI data. The results of the standardized quality control procedure, helped to select data to be included in this project. After this initial quality review, the harmonized pre-processing, according to the technical meeting held in November 2018 at the NRU in Milan, was implemented on these data. Then, we selected the software to be compared for the quantification of atrophy of the whole brain and the gray matter. Next steps will involve the application of the selected atrophy pipelines, according to the previously described criteria, on the finally collected dataset (both cross-sectionally and longitudinally) and the results on these comparisons will be provided. Subsequently, the morphometric abnormalities in MS patient voxel-wise and the longitudinal trajectories of their progression will be defined. Finally, we will focus on the comparison between automatic segmentation methods of the thalamic structure. Based on the results obtained, suggested guidelines for the MR acquisition and analysis for a reliable whole-brain, GM and thalamic atrophy quantification in MS will be provided.

Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con sclerosi multipla



Nicola De Stefano

Dipartimento Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università degli Studi 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 ippocampi 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 70 di questi pazienti e circa 1000 controlli precedentemente selezionati, abbiamo eseguito una prima 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.

Questo passaggio è in corso e terminerà nei prossimi sei mesi (fino a 18 mesi) e porterà all'analisi di tutti i 300 pazienti con SM e 1.000 controlli.

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 are:

1. To use a semi-automated procedure implemented in the Lab to assess hippocampal volumes on RRMS patients at the early disease stages (disease duration < 5 years) 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.

As planned, the first 12 months of this 36-month project have been dedicated at the selection of the MRI dataset to analyze and at its quality control. In this respect, we identified about 300 MS patients with an early-stage of MS (First Milestone). On 70 of these patients and about 1,000 previously selected HC, we run FIRST on all the preprocessed 3D T1-weighted MRI scans and we are presently performing the manual correction of hippocampal volume masks of all patients (part of the Second Milestone). This step is ongoing and will end in the next six months (up to 18 months) by including the total of 300 MS patients and 1000 HC.

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. Perciò, lo scopo del progetto è 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. Inoltre si propone di determinare l'incremento lineare del danno strutturale con la progressione della malattia, la prima riorganizzazione funzionale che termina con un collasso funzionale e un aumento della disabilità clinica a partire dall'esaurimento del meccanismo funzionale adattivo. Vogliamo convalidare il modello in una vasta popolazione di persone con SM e collegare il modello alla connettività funzionale (FC) tra strutture cerebrali specifiche, al fine di:

1. valutare se l'esaurimento dei meccanismi adattativi funzionali corrisponde all'inizio dell'accumulo di disabilità;

2. individuare le strutture cerebrali per le quali il modello si adatta al meglio, per quanto possibile agli obiettivi terapeutici per la riabilitazione o la farmacoterapia.

Durante questo primo anno, abbiamo acquisito i dati RM di 970 pazienti e 395 controlli. Abbiamo ottimizzato una pipeline per eseguire la preelaborazione strutturale e la RM funzionale resting state (RS fMRI) di immagini 3D precedentemente pesate in T1 (dal gruppo di Milano). Finora abbiamo pre-elaborato 150 pazienti e 133 HC. Ulteriori dati pre-elaborati ponderati in 3D T1 verranno trasferiti a breve da Milano per eseguire le pipeline già ottimizzate. Per verificare la stabilità dei dati RS, abbiamo confrontato RS fMRI tra i centri. Questa analisi preliminare indica che non è necessaria alcuna ulteriore correzione per le differenze nei parametri di RM tra i centri.

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 aim of the project is to validate a non-linear model to explain the combination of structural damage, functional reorganization and disability over time in MS. The non-linear model combines structural damage, functional reorganization and disability over time and designs a linear increment of structural damage with disease progression, an early uprising of functional reorganization ending in functional collapse and an increase in clinical disability starting when functional adaptive mechanisms are exhausted. The main aim of this projects is to validate the model 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 this first year, we have downloaded the MRI data of 970 patients and 395 HC. We optimized a pipeline to perform structural and resting state (RS) fMRI preprocessing of previously brain-extracted 3D T1-weighted images (from the Milan group).

So far we have preprocessed 150 patients and 133 HC. Additional 3D T1-weighted pre-processed data will be transferred shortly from Milan to run the already optimized pipelines. To check for stability in RS data, we compared RS fMRI between centers. This preliminary analysis indicates that no further correction for differences in MRI parameters among centers is required for seed-based analysis.

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 affetti da sclerosi multipla (SM) 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.

Utilizzando l'ampio, multicentrico e unico set di dati di RM del progetto INNI, il nostro obiettivo sarà quello di esplorare i substrati strutturali e funzionali del disadattamento cognitivo-radiologico osservato nei pazienti con SM. In particolare, esamineremo i cambiamenti strutturali e funzionali che portano a compromissione cognitiva nei pazienti con SM con diverso carico della malattia.

In particolare, identificheremo innanzitutto: un sottogruppo di pazienti con sclerosi multipla con volume di lesione T2 basso (cioè 1 ° quartile) (LLV) e un sottogruppo di pazienti con sclerosi multipla con volume di lesione T2 alto (cioè 4 ° quartile) (HLV). In ogni sottogruppo identificheremo i pazienti con SM cognitivamente conservati (CP) e cognitivamente compromessi (CI). Prima dell'analisi i quattro sottogruppi (CP-LLV; CI-LLV; CP-HLV; CI-HLV) saranno accuratamente abbinati per le variabili demografiche (genere, età, istruzione) e cliniche (fenotipo della malattia, durata della malattia, tasso di ricaduta).

Durante i primi 12 mesi l'Unità ha costantemente lavorato, insieme al centro di coordinamento, sull'attuazione delle procedure che verranno utilizzate per selezionare e acquisire dalla piattaforma INNI i (grandi) dati necessari per eseguire le analisi pianificate per il progetto specifico del centro. Utilizzando il set di dati del progetto INNI, il nostro obiettivo sarà quello di esplorare i substrati strutturali e funzionali del disadattamento cognitivo-radiologico osservato nelle persone con SM.

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. Using the unique and very large, multicenter, structural and functional 3T-MRI dataset of the INNI project, our aim will be to explore the structural and functional substrates of the cognitive-radiological mismatch observed in MS patients. In particular, we will look at structural and functional changes leading to cognitive impairment in MS patients with different burden of the disease.

More specifically, we will first identify: a subgroup of MS

patients with low (i.e. 1st quartile) T2 lesion volume (LLV) and, a subgroup of MS patients with high (i.e. 4th quartile) T2 lesion volume (HLV). In each subgroup we will identify cognitively preserved (CP) and cognitively impaired (CI) MS patients. Before the between-group analysis the four subgroups (CP-LLV; CI-LLV; CP-HLV; CI-HLV) will be carefully matched for demographic (gender, age, education) and clinical (disease phenotype, disease duration, relapse rate) variables.

During the first 12 months the Unit has been constantly working, together with the coordinating center, on the implementation of the procedures that will be used to select and download, from the INNI platform, the (big) data necessary to run the planned analyses for the center-specific project. In particular, the Unit plans to start downloading data from INNI platform in the next weeks and to start running the pre-processing of MRI (big) data by the end of the current year.



PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Publications

- 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* 2019 [epub ahead of print 9 January 2019; doi: 10.1177/1352458518820759] IF: 4.840
- 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* 2019 [epub ahead of print 18 January 2019; doi: 10.1177/1352458518822145] IF: 4.840

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* 2018; 24 (S2): 239
- 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* 2018; 24 (S2): 317-318
- 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* 2018; 24 (S2): 410-411
- 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
- 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
- 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
- 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
- Storelli L, Rocca MA, Pagani P, 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. *Neurology* 2019; 92 (15 Supplement): P5.2-034
- 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. Accepted as e-presentation at the 5th EAN Congress - Oslo, 29th June-2nd July 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

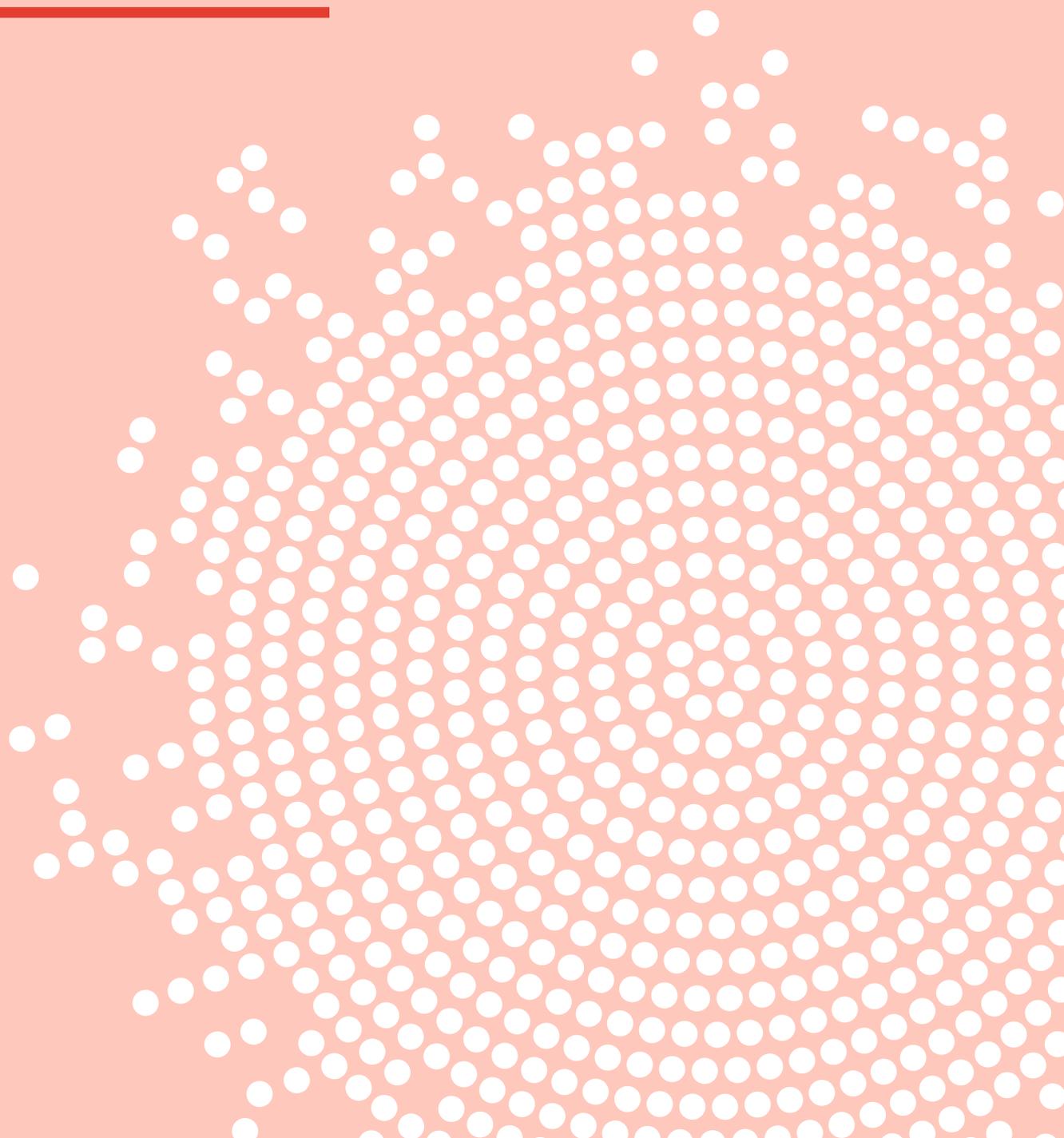
Invited lectureships

- M.A. Rocca. (Really) Big data sources for MS: experience from the Italian Neuroimaging Network Initiative and other Initiative. MAGNIMS workshop on "Big data and deep learning: new avenues for MRI in MS?" Amsterdam, April 13th 2018
- P. Valsasina, M. Filippi. Harmonisation on Big-Data: is it feasible? INNI experience MAGNIMS Workshop: "Harmonization on MRI data in multicenter studies." Siena, November 9th 2018
- M. Filippi. MRI in MS: from single-center data to INNI. Congresso Scientifico Nazionale AISM. Rome, May 29th-31st 2019

Fondi totali: 865.790 € per 3 anni (642.640 € per l'infrastruttura; 223.150 € per progetti specifici)
Total fund: euros € 865,790 for three years (€ 642.640 for infrastructure; € 223.150 for specific projects)

**PROGETTI DI RICERCA
E BORSE DI STUDIO FINANZIATI
DA FISM 2019, 2018**

FUNDED RESEARCH PROJECTS
AND FELLOWSHIPS 2019, 2018



Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2019

FISM funded research projects and fellowships 2019

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Ambra Bisio

Università degli Studi di Genova,
Dipartimento di Medicina Sperimentale, Genova

L'osservazione d'azione e l'immaginazione motoria causano affaticamento nella SM? Valutazione della loro applicabilità nelle forme progressive

Can action observation and motor imagery training cause fatigue in MS? Assessment of their feasibility in the progressive forms

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 52.845 - 1 anno / year

Laura Bonzano

Università degli Studi di Genova, DINOGMI,
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia,
Genetica e Scienze Materno-Infantili, Genova

Trasferimento interemisferico di informazioni nella sclerosi multipla: un approccio multimodale di coregistrazione TMS-EEG, MRI e coordinazione bimanuale

Interhemispheric information transfer in multiple sclerosis: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and bimanual coordination

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 182.522 - 2 anni / years

Maria Grazia Grasso

Fondazione Santa Lucia,
Neuroriabilitazione 5, Roma

Valutazione dell'efficacia della riabilitazione logopedica con aggiunta della stimolazione elettrica neuromuscolare vs logopedia da sola in soggetti affetti da sclerosi multipla e disfagia

To evaluate the activity and the efficacy of traditional swallowing therapy (TST) plus neuromuscular electrostimulation (NMES) vs TST plus sham-NMES in MS patients with dysphagia

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 210.000 - 2 anni / years

Giampiero Merati

Università degli Studi di Milano,
Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute,
Gallarate (VA)

Sensibilità al calore nella sclerosi multipla: uso combinato di questionari e test funzionali

Assessing heat sensitivity in multiple sclerosis: combined use of questionnaire and functional testing

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 28.694,74 - 1 anno / year

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Vincenzo Barnaba

Sapienza Università di Roma,
Dipartimento Medicina Interna e Specialità Mediche, Roma

Interazione tra cellule T autoreattive e cellule T regolatorie in pazienti con sclerosi multipla

Interplay between autoreactive T cells and regulatory T cells in multiple sclerosis patients

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 174.000 - 3 anni / years

Enrica Boda

Università degli Studi di Torino,
Dipartimento di Neuroscienze "Rita Levi Montalcini",
Orbassano (TO)

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Giacomo Boffa

Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière Hôpital Pitié Salpêtrière University, Hospital -Sorbonne University, Paris

Ruolo della demielinizzazione della sostanza grigia nel danno neuronale evidenziato con la tomografia ad emissioni di protoni [11C]Flumazenil nella sclerosi multipla

Contribution of grey matter demyelination to neuronal damage evaluated with [11C]Flumazenil positron emission tomography in multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 80.400 - 2 anni / years

Massimo Costanza

Fondazione IRCCS, Istituto Neurologico Carlo Besta, Dipartimento Neuroscienze Cliniche, Milano

Il ruolo del DNA extracellulare rilasciato dai linfociti T helper (THREDS) nell'infiammazione autoimmune e nella neurodegenerazione del sistema nervoso centrale

The role of T-helper-released extracellular DNAs (THREDS) in autoimmune inflammation and neurodegeneration of the central nervous system

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 75.000 - 1 anno / year

Sandra D'Alfonso

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

Mappatura fine e caratterizzazione funzionale dei loci associati alla SM per analizzare il ruolo patogenetico dei geni bersaglio dei farmaci

Fine mapping and functional characterization of MS associated loci to dissect the pathogenetic role of drug target genes

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 200.000 - 2 anni / years

Francesca Ietta

Università degli Studi di Siena, Dipartimento Scienze della Vita, Siena

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€30.000 - 1 anno / year

Giuseppe Locatelli

University of Bern, Theodor Kocher Institute, Bern, Swiss

Centralità patologica dei fagociti durante la sclerosi multipla: meccanismi di infiltrazione, funzionalità e ruolo regolatore di IGF-1

Deciphering phagocytes in multiple sclerosis: invading routes, in situ dynamics and regulation by insulin-like growth factor 1

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 60.000 - 2 anni / years

Michela Matteoli

Humanitas University, Dipartimento di Scienze Biomediche, Pieve Emanuele (MI)

Un modello umanizzato di barriera ematoencefalica per investigare l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nella sclerosi multipla: verso un approccio di medicina personalizzata

A humanized model of blood brain barrier to investigate immune cells infiltration in multiple sclerosis: toward a personalized medicine approach

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 200.000 - 3 anni / years

Elisabetta Coppi

Università degli Studi di Firenze, NEUROFARBA, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Firenze

I recettori A2B per l'adenosina modulano correnti al K+ necessarie per la differenziazione oligodendrocitaria: possibile coinvolgimento della via di Sfingosina-1-fosfato

A2B adenosine receptors modulate K+ currents necessary to oligodendroglial differentiation and myelin deposition: involvement of Sphingosine-1-phosphate signaling pathway

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 52.000 - 2 anni / years

Christian Cordano

Università degli Studi di Genova, DINOGMI Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Genova

Potenziali evocati visivi e tomografia a coerenza ottica nell'EAE - un modello per comprendere la neuropatologia della reazione immune a diversi antigeni nella SM

Visual evoked potential and optical coherence tomography in EAE - a model for understanding the neuropathology of the immune reaction to different antigens in MS 3

Borsa alla Carriera Rita Levi Montalcini / Rita Levi Montalcini Career Fellowship - € 470.000 - 3 anni / years

Elena Morandi

INSERM Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan (CPTP), Equipe 5, Inflammatory diseases of the central nervous system: mechanisms and therapies, Toulouse, France

Analisi dei meccanismi attraverso i quali la variante genetica Gly307Ser associata alla sclerosi multipla influenza la funzione dei linfociti T

Investigation of the mechanisms by which the multiple sclerosis associated genetic variant CD226 Gly307Ser influences T cell functions

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 142.800 - 3 anni / years

Roberta Rizzo

Università degli Studi di Ferrara,
Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Ferrara

Infezioni da herpesvirus in pazienti con sclerosi multipla positivi per KIR2DL2: meccanismi che attivano l'autoimmunità

Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive multiple sclerosis patients: mechanisms triggering autoimmunity

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 90.000 - 2 anni / years

Antonio Uccelli

Ospedale Policlinico San Martino, IRCCS,
U.O. Clinica Neurologica, Genova

Comprendere il controllo neurale della linfopoiesi nell'encefalite autoimmune sperimentale per designare nuove terapie e monitorare l'attivazione del sistema immunitario nella sclerosi multipla

Exploiting a neural reflex to reduce generation of T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and monitor immune system activation in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 240.000 - 3 anni / years

Elena Zenaro

Università degli Studi di Verona, Medicina, Verona

Caratterizzazione delle interazioni neutrofilo-astrocita nella encefalomielite sperimentale autoimmune

Characterization of neutrophil-astrocyte interplay in experimental autoimmune encephalomyelitis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 24.000 - 1 anno / year

DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE

Maura Casadio

Università degli Studi di Genova, DIBRIS,
Dipartimento di Informatica, Bioingegneria,
Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Genova

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Pasquina Marzola

Università degli Studi di Verona,
Dipartimento Computer Science, Verona

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Paolo Preziosa

Fondazione Centro San Raffaele, INSPE,
Istituto di Neurologia Sperimentale,
Divisione di Neuroscienze, Unità di Neuroimaging
della sostanza bianca del SNC, Milano

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

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

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 102.000 - 3 anni / years

Maura Pugliatti

Università degli Studi di Ferrara, Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico Specialistiche, Sezione di Scienze Neurologiche Psichiatriche e Psicologiche, Ferrara

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)

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 26.540 - 1 anno / year

Loredana Storelli

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale INSPE, Divisione di Neuroscienze, Neuroimaging Research Unit, Milano

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

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

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 26.000 - 1 anno / year

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Marta Boccazzi

Università degli Studi di Milano, DiSFeB, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano

La differente risposta di precursori oligodendrocitari e oligodendrociti immaturi alla demielinizzazione: implicazioni per nuove strategie rimielinizzanti

Differential response of oligodendrocyte progenitor cells and immature oligodendrocytes to demyelination: implications for novel strategies to improve remyelination

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 69.500 - 2 anni / years

Francesca Fallarino

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Perugia

La proteina prionica un nuovo target farmacologico nella sclerosi multipla

Targeting cellular prion protein in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 216.500 - 3 anni / years

Matteo Gastaldi

Fondazione Istituto Neurologico "Casimiro Mondino", Laboratorio di Neuroimmunologia, Pavia

Anticorpi conformazionali contro proteine neurogliali di superficie in pazienti con sclerosi multipla: rivalutazione di vecchi target e identificazione di nuovi antigeni

Conformational antibodies against neuroglial surface proteins in patients with multiple sclerosis: re-evaluation of old targets and identification of novel antigens

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Silvia Marenga

Fondazione Centro San Raffaele, INSPE Istituto di Neurologia Sperimentale, Milano

Applicazione della stimolazione di corrente diretta transcranica per prevenire il danno al nervo ottico e promuovere la remielinizzazione in modello di topo di encefalomyelite autoimmune sperimentale

Transcranial direct current stimulation applied to prevent optic nerve damage and to promote remyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 68.800 - 2 anni / years

Anna Maria Pugliese

Università degli Studi di Firenze, NEUROFARBA, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Firenze

Nuove strategie terapeutiche di re-mielinizzazione: ruolo dei recettori A2B adenosinergici nella oligodendrogenesi e loro possibile interazione con la via di segnalazione di sfingosina-1-fosfato

New insights for remyelinating therapies: oligodendrogenic role of adenosine A2B receptors and their putative interplay with sphingosine-1-phosphate axis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 110.000 - 2 anni / years

Progetti speciali finanziati da FISM 2019

FISM funded special projects 2019

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Diego Centonze

Unità di Neurologia e Neuroriabilitazione, Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed-IRCCS, Pozzilli (IS)

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

Progetto Speciale / Special Project
2 anni / years € 84.215,5

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Francesco Cucca

Dipartimento di Biomedicina, Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, CNR, Monserrato (CA)

Un toolbox genetico nella scoperta di nuovi farmaci per la SM: lo sviluppo di brevetti di geni candidati

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

Progetto Speciale / Special Project
3 anni / years € 1.050.000

Federica Eva Esposito

Dipartimento di Neurologia, INSPE, Fondazione Centro San Raffaele, Milano

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

Progetto Speciale / Special Project
2 anni / years € 84.000 (funds for the first year)

Monica Ulivelli

Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, UOC di Neurologia e Neurofisiologia Clinica, UOS Diagnosi e Terapia delle Malattie Demyelinizzanti, Siena

Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasmissibili - prevenibili con 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

Progetto Speciale / Special Project
3 anni / years € 80.570,50

Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2018

FISM funded research projects and fellowships 2018

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Marco Caimmi

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Sistemi e Tecnologie Industriali Intelligenti per il Manifatturiero Avanzato (STIIMA), Milano

Studio pilota multicentrico singolo cieco per valutare l'attività e l'efficacia dell'ASSISTarmMS (esoscheletro) sulle ADL correlate all'arto superiore in pazienti con SM

A multicenter single-blind pilot study for evaluating the activity and the efficacy of ASSISTarmMS, an exoskeleton, on upper-limb related ADL in MS patient

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 29.925 - 1 anno / year

Raffaele d'Isa

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

Può la neurostimolazione non-invasiva promuovere la rimielinizzazione? Uno studio pilota preclinico

Can non-invasive neuromodulation promote remyelination? A pilot preclinical study

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 26.700 - 1 anno / year

Letizia Leocani

Università e IRCCS Ospedale San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale - INSPE Dipartimento di Neurologia, Neurofisiologia Clinica e Neuroriabilitazione, Milano

La stimolazione magnetica transcranica ripetitiva col coil-H come trattamento della depressione nella sclerosi multipla progressiva: studio pilota randomizzato in doppio cieco

rTMS with H-coil as a treatment for depression in progressive multiple sclerosis: a pilot randomized double blind study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Andrea Manca

Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

Effetti dell'allenamento eccentrico sulla spasticità e debolezza muscolare degli arti in persone con sclerosi multipla: uno studio pilota

The effects of eccentric strength training on limb spasticity and muscle weakness in people with multiple sclerosis: a pilot study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Sofia Straudi

Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Unità Operativa di Medicina Riabilitativa, Ferrara

Il ruolo del "gaming" nel miglioramento dell'equilibrio e delle funzioni cognitive in pazienti con sclerosi multipla e disabilità lieve o moderata. Uno studio randomizzato controllato

The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 40.000 - 2 anni / years

DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE

Francesca De Vito

Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) Neuromed - IRCCS,
Unità di Neurologia e Unità di Neuroriabilitazione,
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 / Research Fellowship
€ 52.000 - 2 anni / years

Benedetta Bodini

ICM, Sorbonne Universités, Paris VI,
Institut du cerveau et de la moelle épinière (ICM),
Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

Disregolazione energetica e neurodegenerazione nella sclerosi multipla: studio biennale con imaging ad altissimo campo del sodio, spettroscopia del fosforo e spettroscopia pesata in diffusione

Exploring in vivo the energetic origin of
neurodegeneration in multiple sclerosis: a 2-year
ultra-high field sodium imaging, phosphorus
spectroscopy and diffusion-weighted spectroscopy
study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 150.000 - 2 anni / years

Linda Chaabane

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Milano

Sviluppo di un metodo di visualizzazione delle cellule staminali neuronali tramite risonanza magnetica del 19F: ottimizzazione della marcatura, limiti di rilevazione e saggi di biocompatibilità

Set-up of Neural Stem cells Imaging by 19F-MRI:
labeling optimization, detection limits and
biocompatibility tests

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Massimo Filippi

Fondazione Centro San Raffaele, Neuroimaging Research
Unit, INSPE Divisione di Neuroscienze, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 250.000 - 2 anni / years

Su-Chun Huang

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

Combinando morfometria basata sui voxel della tomografia a coerenza ottica e potenziale evocato visivamente multifocale per studiare demyelinizzazione e neurodegenerazione della sclerosi multipla

Combining voxel-based morphometry of optical
coherence tomography and multifocal
visual-evoked potential to study the relationship
between demyelination and neurodegeneration
in multiple sclerosis

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 68.800 - 2 anni / years

Maria Assunta Rocca

Fondazione San Raffaele, Unità di Neuroimaging della
Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale,
Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di
Neuroscienze, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 2 anni / years

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / **PATHOGENESIS AND RISK FACTORS**

Marco Patrone

*Fondazione Centro San Raffaele,
Dipartimento di Immunologia Trapianti e Malattie Infettive,
Unità di Biocristallografia, Milano*

Basi molecolari dell'associazione tra la SM e l'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr

Dissecting the molecular link between MS and Epstein-Barr nuclear antigen 2

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 105.000 - 3 anni / years

Francesca Santoni de Sio

*Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto Telethon per la terapia genica,
Unità meccanismi di tolleranza periferica, Milano*

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 190.000 - 2 anni / years

Stefano Pluchino

*University of Cambridge,
Department of Clinical Neurosciences, Cambridge, UK*

Caratterizzazione e manipolazione delle vie metaboliche responsabili di neuroinfiammazione cronica

Characterisation and manipulation of the metabolic pathways driving chronic neuroinflammation

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 175.000 - 3 anni / years

Veronica De Rosa

*Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale,
(IEOS), Napoli*

Ruolo delle vescicole extracellulari nella regolazione dell'espressione del Foxp3 e della funzione soppressoria in cellule T regolatorie nella sclerosi multipla

Elucidating the extracellular vesicle-associated determinants modulating Foxp3 expression and suppressive function of T regulatory cells in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 270.000 - 3 anni / years

Francesca Gilli

*Dartmouth-Hitchcock Clinic,
DHMC Neurology,
Lebanon, New Hampshire, USA*

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 140.000 - 2 anni / years

Linda Ottoboni

*Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe),
Unità di Neuroimmunologia, Milano*

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Mariarosaria Santillo

*Università degli Studi di Napoli "Federico II",
Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Napoli*

Anticorpi patogenetici diretti contro le cellule che formano mielina in pazienti affetti da sclerosi multipla

Multiple sclerosis pathogenic antibodies targeting myelin forming cells

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Claudia Verderio

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Istituto di Neuroscienze,
Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 144.000 - 2 anni / years

Francesca Cignarella

Washington University in St. Louis,
Neurology, St. Louis, MO, USA

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

Impact of intermittent fasting on a mouse model of multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 85.000 - 2 anni / years

Alice Laroni

Università degli Studi di Genova,
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione,
Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Genova

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Gianvito Martino

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe),
Unità di Neuroimmunologia, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 1 anno / year

Fabrizio Michetti

Università Cattolica del Sacro Cuore,
Istituto di Anatomia Umana e Biologia Cellulare, Roma

La proteina S100B: un potenziale bersaglio terapeutico nella sclerosi multipla. Studio in vivo

The S100B protein as a potential therapeutic target in multiple sclerosis. An in vivo study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Luca Muzio

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Milano

Sviluppo di proteine REcTO per modulare la neuroinfiammazione

Targeting neuroinflammation by REcTO proteins

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Ildiko Szabo

Università degli Studi di Padova,
Dipartimento di Biologia, Padova

Verso l'eliminazione farmacologica specifica di linfociti T patogenici implicati nella sclerosi multipla

Towards specific elimination of autoreactive pathogenic T lymphocytes implicated in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 158.000 - 2 anni / years

Maria Letizia Trincavelli

Università di Pisa, Dipartimento di Farmacia, Pisa

Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17: un bersaglio innovativo per terapie di rimielinizzazione nella sclerosi multipla

Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 235.000 - 2 anni / years

Progetti speciali finanziati da FISM 2018

FISM funded special projects 2018

DATA SHARING / DATA SHARING

Antonio Bertolotto

AOU San Luigi, Neurologia 2 - CRESM (Centro Riferimento Regionale Sclerosi Multipla), Orbassano (TO)

Una banca biologica ed un laboratorio dedicati alla raccolta ed alla distribuzione di campioni biologici di SMPP, la replicazione e la condivisione di dati e la validazione di metodi biologici

A bio-bank and a laboratory devoted to the collection and supply of biological samples of PPMS, the replication and sharing of data, and the validation of biological methods

Progetto Speciale / Special Project
1 anno / year € 100.000

Massimo Filippi

Neuroimaging Research Unit, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM

The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to optimize the use of advanced MRI techniques in patients with MS

Progetto Speciale / Special Project
3 anni / years € 865.790 €

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Giuseppe Matarese

Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

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

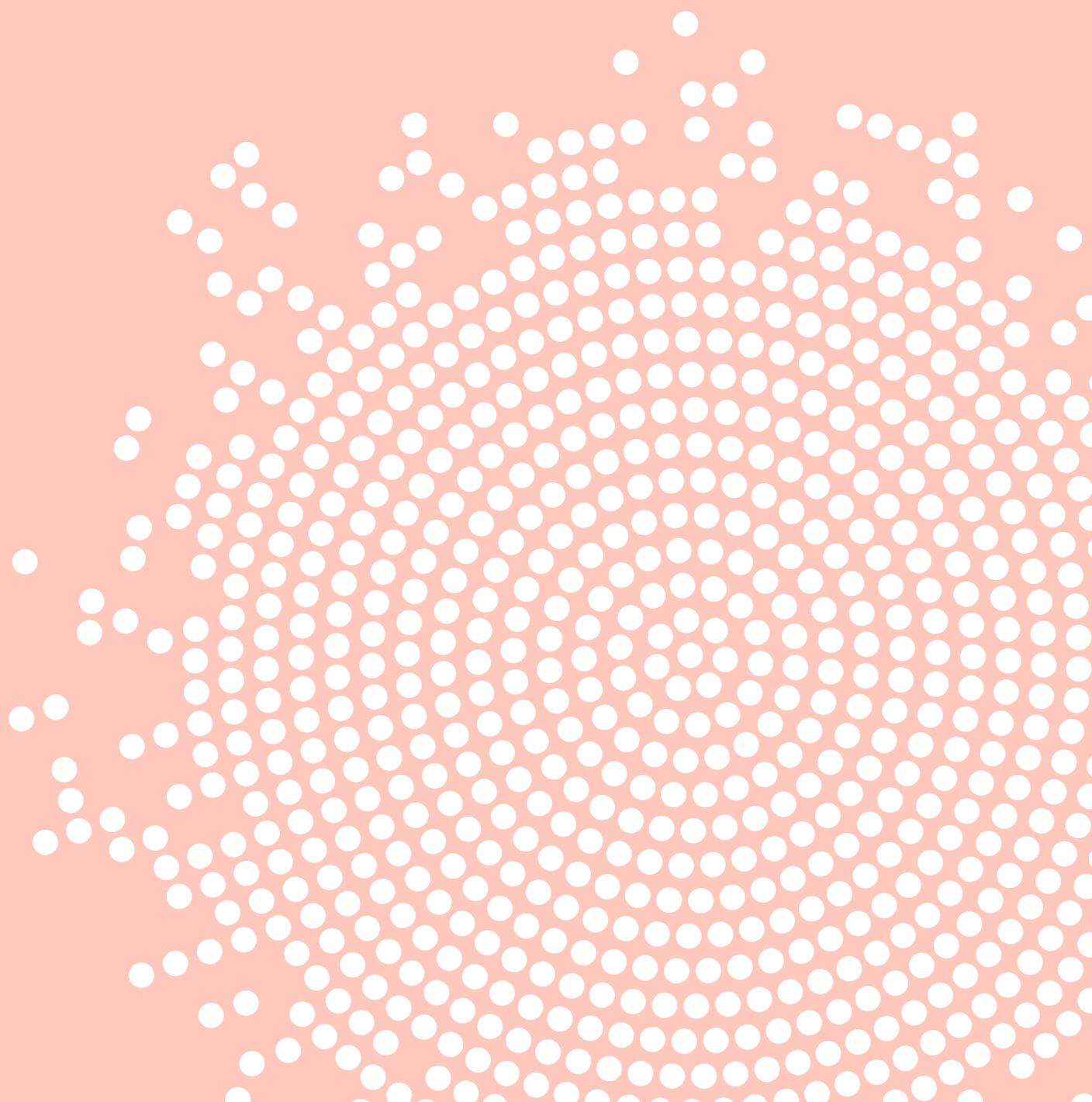
Calorie restriction as a novel therapeutic tool to manipulate immunity and improve therapeutic potential of first line drug treatments during relapsing remitting MS

Progetto Speciale / Special Project
2 anni / years € 466.200

**COMITATO SCIENTIFICO
FISM 2019, 2018**

FISM SCIENTIFIC

COMMITTEE 2019, 2018



Biomedical Research FISM Scientific Committee, 2019

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 Demielinizzanti 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

Raju Kapoor

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK

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 Mattoscio

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, 2019

Giovanni Abbruzzese

DINO GMI, Università degli Studi di Genova, Genova

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

Anders Guldhammer Skjerbæk

MS Hospitals in Denmark, Ry and Haslev, Denmark

Alessandro Verri

DIBRIS, Università degli Studi di Genova, Genova

Biomedical Research FISM Scientific Committee, 2018

Roberta Brambilla

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, Miami, USA

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

Raju Kapoor

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK

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

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, 2018

Giovanni Abbruzzese

DINOGLMI, Università degli Studi di Genova, Genova

Maria Pia Amato

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze, Firenze

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

Letizia Leocani

Unità di Neurofisiologia Sperimentale e MAGICS Center, INSPE, 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

Anders Guldhammer Skjerbæk

MS Hospitals in Denmark, Ry and Haslev, Denmark

Alessandro Verri

DIBRIS, Università degli Studi di Genova, Genova

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