



—● Connecting **MS**

# OUR PATHWAYS TO CURE

## La ricerca sulla sclerosi multipla

Research on multiple sclerosis

**Finanziata dalla Fondazione  
Italiana Sclerosi Multipla**

Funded by the Italian Multiple  
Sclerosis Foundation

**SCLE  
ROSI  
MULT  
IPLA**  
associazione  
italiana

un mondo  
libero dalla SM

**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 - APS/ETS

A cura di:

**Roberta Guglielmino**

Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Progetto e coordinamento editoriale:

**Manuela Capelli**

Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Copyright FISM 2022

Pubblicato e distribuito da:

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - APS/ETS

Via Operai, 40 - 16149 Genova

Tutti i diritti sono riservati.

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

Progetto grafico e impaginazione:

**Alba Bertolini**

Finito di stampare nel mese di maggio 2023

da Ditta Lang Srl - Genova

ISBN 978-88-7148-167-8



# Introduzione / Introduction

---

"Amare il proprio lavoro è la cosa che si avvicina più concretamente alla felicità sulla terra", diceva Rita Levi Montalcini, a lungo Presidente onorario della nostra Associazione. A lei, all'amore appassionato e lucido per la ricerca scientifica sulla SM, dedichiamo ogni anno il nostro principale Premio.

Ma non è solo il ricercatore o la ricercatrice premiata annualmente ad amare la ricerca: è l'intera comunità scientifica che AISM ha costruito negli anni.

Lo certificano, come sempre nella scienza, i nostri "numeri"<sup>1</sup>: in accordo con la nostra mappa strategica di finanziamento, tramite il Bando 2022 FISM ha messo a disposizione dei ricercatori 5,3 milioni di euro, al lordo degli investimenti per la ricerca ed infrastrutture, su diversi campi prioritari per la SM.

Sono 153 i gruppi di ricerca che nel 2023 hanno in corso ricerche finanziate dalla FISM. Sono 718 le pubblicazioni nel periodo 2018-2022 con le ricerche che in questi anni abbiamo presentato nei Compendi annuali della ricerca finanziata. L'eccellenza dei risultati che AISM con la sua Fondazione promuove è dimostrata anche dall'elevato numero di pubblicazioni prodotte dai ricercatori nel solo 2022: 154 pubblicazioni con impact factor medio di 8,2.

La comunità viva e attiva dei ricercatori connessi in AISM opera giorno dopo giorno per individuare, costruire e condividere i "nostri percorsi di ricerca verso la cura" (Our pathways to cure) come vuole il titolo del Congresso scientifico 2023, che fa il punto sulla ricerca per la sclerosi multipla e sui progetti finanziati da FISM.

È utile ricordare che il Congresso 2022, vissuto nuovamente in presenza dopo il tempo della pandemia, ha avuto 300 partecipanti, 52 presentazioni orali e 82 presentazioni poster, dando riscontro anche di importanti progetti speciali, come il Progetto Europeo MULTI\_ACT, concluso nel 2021, che ha portato allo sviluppo di un nuovo modello partecipativo della gestione della ricerca, che coinvolge in maniera attiva le persone con SM nella ricerca con cui si risponde alle esigenze di diverse iniziative di ricerca e cura multistakeholders. Tra queste l'iniziativa globale, in cui FISM funge da leading agency, PROMS- acronimo di "Patient Reported Outcomes for MS" – e la Progressive MS Alliance che puntano a dare sempre più valore alla prospettiva delle persone nella ricerca per la SM.

Questo Compendio della ricerca finanziata da FISM e conclusa nel 2022 continua il lungo percorso di eccellenza che ha portato AISM a costruire una squadra vincente di ricercatori riconosciuti a livello nazionale e internazionale e a rispondere ai bisogni delle persone con SM, che sono il principio e il fine di ogni percorso di ricerca promosso da AISM con la sua Fondazione.

Rendicontiamo qui i risultati ottenuti dai progetti sulla comprensione delle cause genetiche e ambientali e dei fattori di rischio della SM, sul miglioramento della diagnosi e del monitoraggio dell'andamento di malattia, delle ricerche in neuroriabilitazione e qualità della vita e degli innovativi studi finalizzati a individuare nuovi trattamenti.

Di notevole impatto sono anche i progetti speciali qui rendicontati, su medicina personalizzata, sclerosi multipla progressiva e nuovi trattamenti. In evidenza, quest'anno, la rendicontazione dei progetti che utilizzano la banca dati di risonanza magnetica del Progetto INNI (Italian Network on Neuro Imaging).

Inoltre cresce la rendicontazione dei progetti nati dal Registro Italiano Sclerosi Multipla e Patologie Correlate, cui aderiscono oggi oltre 177 Centri clinici, con la raccolta dei dati demografici e clinici di oltre 80.000 persone.

Il nostro è dunque un percorso in continua evoluzione, che, come indica l'Agenda 2025 della sclerosi multipla e patologie correlate consente alle persone con sclerosi multipla di contare sempre di più "su una ricerca rigorosa, di eccellenza, innovativa, orientata alla missione che mira a identificare le cause e i meccanismi di progressione della malattia e a individuare quei trattamenti specifici che hanno una ricaduta concreta sulla qualità di vita in ogni fase della malattia".

**Mario Alberto Battaglia**

*Presidente FISM*

**Paola Zaratin**

*Direttore Ricerca Scientifica FISM*

---

<sup>1</sup> I dati riportati in questa introduzione sono ripresi dal capitolo ricerca del Bilancio sociale 2022: rispondono all'intenzione di fare di questo Compendio un documento che possa essere anche autosufficiente e consenta al ricercatore che legga solo questo di avere un quadro complessivo dell'identità strategica e dell'azione di AISM, focalizzandoci sul tema ricerca.

"To love one's work is the closest thing to happiness on earth," said Rita Levi Montalcini, long-time Honorary President of our Society. To her, to her passionate and lucid love for scientific research on MS, we dedicate our main prize every year. But it is not only the researcher awarded annually who loves research: it is the entire scientific community that AISM has built up over the years.

This is certified, as always in science, by our "numbers"<sup>1</sup>: in accordance with our strategic funding map, through the Call for Proposals 2022 FISM has made 5.3 million euros available to researchers, gross of investments for research and infrastructure, on several priority fields for MS.

A total of 153 research groups are conducting funded research by FISM in 2023. There are 718 publications in the period 2018-2022 with research presented in the Annual Compendiums of Funded Research. The excellence of the results that AISM with its Foundation promotes is also demonstrated by the high number of publications produced by researchers in 2022 alone: 154 publications with an average impact factor of 8.2.

The lively and active community of researchers connected to AISM works day after day to identify, build and share "our research pathways to cure" as the title of the Scientific Congress 2023 suggests, taking stock of multiple sclerosis research and the projects financed by FISM.

It is worth remembering that the 2022 Congress, experienced again in presence after the time of the pandemic, had 300 participants, 52 oral presentations and 82 poster presentations, also giving feedback on important special projects, such as the European Project MULTI\_ACT, concluded in 2021, which led to the development of a new participatory model of research management, which actively involves people with MS in research and which responds to the needs of various multi-stakeholder research and care initiatives. These include the global initiative, in which FISM acts as the leading agency, PROMS - an acronym for 'Patient Reported Outcomes for MS' - and the Progressive MS Alliance, which aim to increasingly value the people's perspective in MS research.

This Compendium of the research funded by FISM and concluded in 2022 continues the long path of excellence that has led AISM to build a winning team of nationally and internationally recognized researchers and to respond to the needs of people with MS, which are the principle and the aim of every research path promoted by AISM with its Foundation.

We report here on the results achieved by projects on understanding the genetic and environmental causes and risk factors of MS, on improving diagnosis and monitoring of disease progression, on research in neurorehabilitation and quality of life, and on innovative studies aimed at identifying new treatments.

Also noteworthy are the special projects reported here, on personalized medicine, progressive multiple sclerosis and new treatments. Highlighted this year is the reporting of projects using the magnetic resonance database of the INNI Project (Italian Network on Neuro Imaging).

Also growing is the reporting of the projects created by the Italian Multiple Sclerosis & Related Disorders Register, to which more than 177 clinical Centers now belong, with the collection of demographic and clinical data on more than 80,000 people.

Ours is therefore an ever-evolving pathway, which, as the Agenda 2025 of Multiple Sclerosis and Related Disorders indicates, allows people with multiple sclerosis to rely more and more on "rigorous, excellent, innovative, mission-oriented research that aims to identify the causes and mechanisms of disease progression and to identify those specific treatments that have a concrete impact on the quality of life at every stage of the disease".

## **Mario Alberto Battaglia**

*Chairman of the Italian  
Multiple Sclerosis Foundation*

## **Paola Zarin**

*Director of Scientific Research for the  
Italian Multiple Sclerosis Foundation*

---

<sup>1</sup> The data reported in this introduction are taken from the research chapter of the 2022 Social Report: they respond to the intention of making this Compendium a document that can also be self-sufficient and allows the researcher who reads only this to have an overall picture of the strategic identity and action of AISM, focusing on the research theme.

# RICERCA / RESEARCH

# 96

**progetti attivi**  
active projects

# 5,3 milioni / 5.3 million €

**stanziati per la ricerca scientifica nel 2022**  
allocated to scientific research in 2022

# 153

**gruppi di ricerca attivi**  
active research groups

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla, attraverso la sua Fondazione (FISM), promuove e orienta la ricerca scientifica sulla sclerosi multipla in Italia e ne è la principale finanziatrice: sostiene il percorso scientifico dei ricercatori di talento, tramite un bando annuale di carattere generale rispetto agli obiettivi di ricerca, bandi dedicati a programmi speciali, la partecipazione a progetti internazionali, la promozione e il finanziamento di centri/network di eccellenza e infrastrutture di ricerca.

Per individuare terapie e trattamenti efficaci a rallentare il decorso della malattia e per trovare, domani, una cura risolutiva, AISM e FISM hanno guidato il talento e la passione dei ricercatori negli ambiti di ricerca più promettenti, investendo oltre 40 milioni di euro negli ultimi 6 anni. Hanno contribuito al posizionamento di eccellenza del sistema di ricerca italiano; oltre a finanziare la ricerca extramurale e intramurale, hanno sviluppato modelli europei innovativi di partnership finalizzati a promuovere un unico ecosistema tra ricerca e cura.

Tutte le persone con SM e patologie correlate, loro caregiver e familiari hanno diritto a una ricerca scientifica rigorosa, di eccellenza e innovativa che sia indirizzata, promossa e finanziata, in modo coresponsabile da tutti gli attori che condividono questa missione, verso una cura personalizzata. Un diritto alla ricerca che si deve esplicitare anche attraverso la cittadinanza scientifica: la conoscenza e il coinvolgimento di tutti i cittadini – non solo delle persone interessate – per garantire la piena partecipazione e la traduzione della ricerca in risposte concrete per le persone e per la società (cfr. Agenda della sclerosi multipla e patologie correlate 2025).

La ricerca FISM è finanziata in accordo con la mappa strategica di finanziamento AISM-FISM.



- 1) Fund and forget, finanzia e dimentica:** investire nell'innovazione, basata sulle idee del ricercatore
- 2) Select and oversee, seleziona e monitora:** sostenere un'area di ricerca specifica e monitorare i progressi della ricerca
- 3) Open and integrate, aprire e integrare:** sostenere insieme anche 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
- 4) Commit and integrate, impegno e integrazione con tutti gli attori coinvolti:** l'impegno delle fondazioni a sostenere aree di ricerca strategiche integrando le competenze di tutti gli attori (stakeholder) coinvolti

# 154

pubblicazioni  
publications

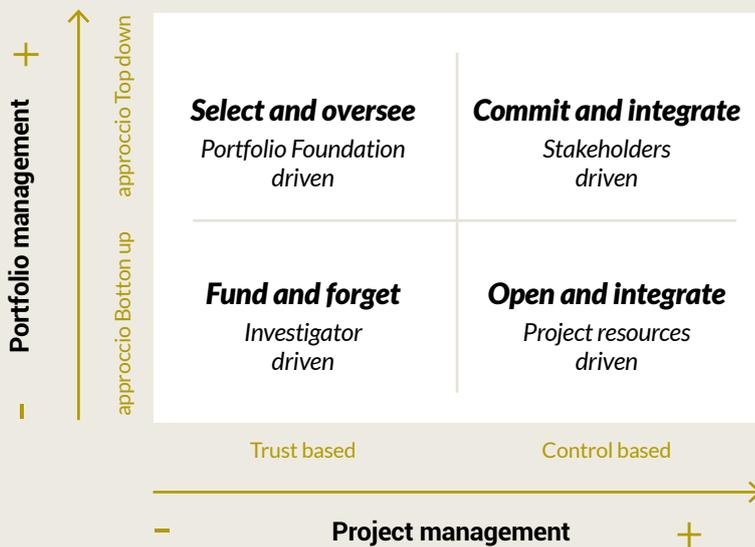
con impact factor medio di **8,2**  
with an average impact factor of

The Italian Multiple Sclerosis Association, through its Foundation (FISM), promotes and guides research on multiple sclerosis in Italy and is its main funder: it supports the scientific path of talented researchers, through an annual call of a general nature with respect to the research objectives, calls dedicated to special programs, participation in international projects, promotion and financing of centers / networks of excellence and research infrastructures.

To identify effective therapies and treatments to slow down the course of the disease and to find, tomorrow, a definitive cure, AISM and FISM have guided the talent and passion of researchers in the most promising research areas, investing over 40 million euros in the last 6 years. They have contributed to the positioning of excellence of the Italian research system; in addition to funding extramural and intramural research, they have developed innovative European models of partnerships aimed at promoting a single ecosystem between research and care.

All people with MS and related diseases, their caregivers and family members have the right to rigorous, excellent and innovative scientific research that is directed, promoted and funded, in a co-responsible way by all the actors who share this mission, towards personalized care. A right to research that must also be expressed through scientific citizenship: the knowledge and involvement of all citizens – not only the persons concerned – to ensure full participation and the translation of research into tangible answers for people and for society (cfr. Multiple sclerosis and related diseases Agenda 2025).

FISM research is funded in accordance with the AISM-FISM funding strategy map.



- 1) Fund and forget:** investing in innovation, based on the ideas of the researcher;
- 2) Select and oversee, select and monitor:** support a specific research area and monitor research progress
- 3) Open and integrate, open and integrate:** support together with other research institutions, research infrastructures and resources for their management also to ensure that research results are shared
- 4) Commit and integrate, commitment and integration with all the actors involved:** the commitment of the foundations to support strategic research areas by integrating the skills of all the actors (stakeholders) involved

## Lista degli autori / List of Authors

---

Abbracchio Maria Pia	51, 133	Giovannetti Ambra Mara	112
Agresti Cristina	61	Granchi Carlotta	75
Amato Maria Pia	123, 202	Inglese Matilde	217
Barresi Giacinto	126	Locatelli Giuseppe	37
Battistini Luca	156	Manacorda Tommaso	104
Bergamaschi Roberto	200	Marasco Daniela	78
Bertolotto Antonio	136	Marenna Silvia	70
Bezzini Daiana	129	Matarese Giuseppe	156
Bigi Rachele	40	Mechelli Rosella	23
Bisio Ambra	87	Merati Giampiero	90
Boccazzi Marta	64	Pantano Patrizia	178
Boffa Giacomo	47	Paolicelli Damiano	205
Bonzano Laura	44	Patrone Marco	26
Bozzoli Federico	109	Pedullà Ludovico	109
Brichetto Giampaolo	117	Pluchino Stefano	58
Caimmi Marco	96	Podda Jessica	120
Cambiaghi Marco	99	Ponzio Michela	106
Cappellano Giuseppe	73	Ristori Giovanni	161
Capobianco Marco	136, 224	Rizzo Roberta	29
Coppi Elisabetta	67	Sormani Maria Pia	141
Cucca Francesco	145, 149	Straudi Sofia	93
D'Alfonso Sandra	18	Szabo Ildiko	83
De Stefano Nicola	180	Tedeschi Gioachino	183
Eberini Ivano	133	Trincavelli Maria Letizia	55
Esposito Federica Eva	153	Trojano Maria	208
Farina Cinthia	33	Tuosto Loretta	80
Filippi Massimo	174	Ulivelli Monica	165
Gallo Antonio	183, 221		

# Indice / Index

---

<b>INTRODUZIONE / INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
Mario A. Battaglia Paola Zarin	
<b>LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF AUTHORS</b>	<b>8</b>
<b>PROGETTI BANDO FISM TERMINATI NEL 2022</b> FISM CALL PROJECTS ENDED IN 2022	<b>16</b>
<b>SCOPRIRE LE CAUSE DELLA SM E I FATTORI DI RISCHIO</b> DISCOVERING THE CAUSES OF MS AND RISK FACTORS	<b>17</b>
<b>Sandra D'Alfonso</b>	<b>18</b>
<b>Mappatura fine e caratterizzazione funzionale dei loci associati alla SM per analizzare il ruolo patogenetico dei geni bersaglio dei farmaci</b> Fine mapping and functional characterization of MS associated loci to dissect the pathogenetic role of drug target genes	
<b>Rosella Mechelli</b>	<b>23</b>
<b>I genotipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla ed i loro ruolo funzionale nell'eziologia della malattia</b> Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis and their functional relevance in the disease etiology	
<b>Marco Patrone</b>	<b>26</b>
<b>Dissecting the molecular link between MS and Epstein-Barr nuclear antigen 2</b> Basi molecolari dell'associazione tra la SM e l'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr	
<b>Roberta Rizzo</b>	<b>29</b>
<b>Infezioni da herpesvirus in pazienti con sclerosi multipla positivi per KIR2DL2: meccanismi che attivano l'autoimmunità</b> Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive multiple sclerosis patients: mechanisms triggering autoimmunity	
<b>Cinthia Farina</b>	<b>33</b>
<b>Meccanismi di controllo astrocitario nella neuroinfiammazione</b> Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation	
<b>Giuseppe Locatelli</b>	<b>37</b>
<b>Centralità patologica dei fagociti durante la sclerosi multipla: meccanismi di infiltrazione, funzionalità, e ruolo regolatore di IGF-1</b> Deciphering phagocytes in multiple sclerosis: invading routes, in situ dynamics, and regulation by insulin-like growth factor 1	
<b>Rachele Bigi</b>	<b>40</b>
<b>Ricerca di effettori decisivi delle alterazioni del reguloma nella SM: disregolazione LMP1-mediata di AID nella patogenesi della SM</b> Looking for final effectors or regulome alterations in MS: LMP1-mediated dysregulation of AID in MS pathogenesis	
<b>DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA</b> DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE	<b>43</b>
<b>Laura Bonzano</b>	<b>44</b>
<b>Trasferimento interemisferico di informazioni nella sclerosi multipla: un approccio multimodale di coregistrazione TMS-EEG, MRI e coordinazione bimanuale</b> Interhemispheric information transfer in multiple sclerosis: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and bimanual coordination	

<b>Giacomo Boffa</b>	<b>47</b>
<b>Ruolo della demielinizzazione della sostanza grigia nel danno neuronale evidenziato con la Tomografia ad Emissioni di Protoni [11C] Flumazenil nella SM</b>	
Contribution of grey matter demyelination to neuronal damage evaluated with [11C]Flumazenil Positron Emission Tomography in MS	
<b>VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS</b>	<b>50</b>
<b>Maria Pia Abbraccio</b>	<b>51</b>
Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario	
Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17	
<b>Maria Letizia Trincavelli</b>	<b>55</b>
<b>Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17: un bersaglio innovativo per terapie di rimielinizzazione nella SM</b>	
Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in MS	
<b>Stefano Pluchino</b>	<b>58</b>
<b>Caratterizzazione e manipolazione delle vie metaboliche responsabili di neuroinfiammazione cronica</b>	
Characterization and manipulation of the metabolic pathways driving chronic neuroinflammation	
<b>Cristina Agresti</b>	<b>61</b>
<b>Identificazione e validazione dei target rimielinizzanti dell'edaravone nei progenitori degli oligodendrociti</b>	
Identification and validation of edaravone remyelinating targets in oligodendrocyte progenitor cells	
<b>Marta Boccazzi</b>	<b>64</b>
<b>La differente risposta di precursori oligodendrocitari e oligodendrociti immaturi alla demielinizzazione: implicazioni per nuove strategie rimielinizzanti</b>	
Differential response of oligodendrocyte progenitor cells and immature oligodendrocytes to demyelination: implications for novel strategies to improve remyelination	
<b>Elisabetta Coppi</b>	<b>67</b>
<b>I recettori A2B per l'adenosina modulano correnti al K<sup>+</sup> necessarie per la differenziazione oligodendrocitaria: possibile coinvolgimento della di via Sfingosina-1-fosfato</b>	
A2B adenosine receptors modulate K <sup>+</sup> currents necessary to oligodendroglial differentiation and myelin deposition: involvement of Sphingosine-1-phosphate signaling pathway	
<b>Silvia Marenna</b>	<b>70</b>
<b>Applicazione della stimolazione di corrente diretta transcranica per prevenire il danno al nervo ottico e promuovere la remielinizzazione in modello di topo di encefalomielite autoimmune sperimentale</b>	
Transcranial direct current stimulation applied to prevent optic nerve damage and to promote remyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model	
<b>Giuseppe Cappellano</b>	<b>73</b>
<b>Legame di osteopontina al suo nuovo recettore ICOSL: caratterizzazione funzionale di tale interazione nell'EAE</b>	
Binding of osteopontin to its newly identified receptor ICOSL: exploring their Relevance and Activity IN EAE (BRAIN-EAE)	
<b>Carlotta Granchi</b>	<b>75</b>
<b>Il sistema endocannabinoide come bersaglio per combattere la sclerosi multipla: degradazione della monoacilglicerolo lipasi da parte dei PROTACs</b>	
Targeting the endocannabinoid system to fight multiple sclerosis: monoacylglycerol lipase degradation by PROTACs	
<b>Daniela Marasco</b>	<b>78</b>
<b>Progettazione e studi funzionali dell'efficacia terapeutica di nuovi mimetici di SOCS1 nella sclerosi multipla</b>	
Design and functional investigations of the therapeutic efficacy of novel SOCS1 mimetics in multiple sclerosis	

<b>Loretta Tuosto</b>	<b>80</b>
<b>Il CD28 come bersaglio di una strategia terapeutica per prevenire le risposte infiammatorie dei linfociti T helper indotte dai superantigeni virali e batterici nei pazienti con SM</b>	
Selective targeting of CD28 costimulatory molecule as a therapeutic strategy for preventing inflammatory responses of T helper cells induced by viral and bacterial superantigens in MS patients	
<b>Ildiko Szabo</b>	<b>83</b>
<b>Verso l'eliminazione farmacologica specifica di linfociti T patogenici implicati nella sclerosi multipla</b>	
Towards specific elimination of autoreactive pathogenic T lymphocytes implicated in multiple sclerosis	
<b>NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA</b>	<b>86</b>
<b>NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE</b>	
<b>Ambra Bisio</b>	<b>87</b>
<b>L'osservazione d'azione e l'immaginazione motoria causano affaticamento nella SM? Valutazione della loro applicabilità nelle forme progressive</b>	
Can action observation and motor imagery training cause fatigability in MS? Assessment of their feasibility in the progressive forms	
<b>Giampiero Merati</b>	<b>90</b>
<b>Sensibilità al calore nella sclerosi multipla: uso combinato di questionari e test funzionali</b>	
Assessing heat sensitivity in multiple sclerosis: combined use of questionnaire and functional testing	
<b>Sofia Straudi</b>	<b>93</b>
<b>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</b>	
The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial	
<b>Marco Caimmi</b>	<b>96</b>
<b>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</b>	
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	
<b>Marco Cambiaghi</b>	<b>99</b>
<b>Depressione e sclerosi multipla: uno studio pilota per esaminare gli effetti della tDCS sull'interazione neurone-glia nel modello EAE</b>	
Depression and multiple sclerosis: a pilot study to explore the effects of tDCS on neuro-glia interaction in the EAE model	
<b>PROGETTI SPECIALI / SPECIAL PROJECTS</b>	<b>101</b>
<b>Introduzione / Introduction</b>	<b>102</b>
<b>MEDICINA PERSONALIZZATA / PERSONALIZED MEDICINE</b>	<b>103</b>
<b>Tommaso Manacorda</b>	<b>104</b>
<b>Trasformare la cura della sclerosi multipla in Italia attraverso il PDTA e la Rete della SM. Un'indagine sui centri clinici</b>	
Transforming multiple sclerosis care in Italy through Integrated Care Pathways and local networks of service providers. A survey on clinical centres	
<b>Michela Ponzio</b>	<b>106</b>
<b>Studio di ricerca sulla percezione di competenza delle persone che prendono cura o assistono un familiare con la sclerosi multipla</b>	
A study of the sense of competence in family caregivers of people with multiple sclerosis	

- Federico Bozzoli, Ludovico Pedullà** 109  
**MyMood: sviluppo di nuovi patient-reported outcomes sui disturbi dell'umore nella sclerosi multipla. Un approccio di co-creazione tramite la scienza basata su input del e con il paziente**  
 MyMood: developing new patient-reported outcomes on mood disorders in multiple sclerosis.  
 An approach of co-creation through science of and with patient input
- Ambra Mara Giovannetti** 112  
**Allestimento italiano del programma "REsilience and Activity every DaY for multiple sclerosis", 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 multiple sclerosis", of outcomes, and pilot assesssclerosi multiplaent of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)
- Giampaolo Brichetto** 117  
**Un nuovo profilo funzionale per monitorare la progressione della disabilità nella sclerosi multipla (PROMOPRO-MS)**  
 A new functional profile to monitor the progression of disability in MS (PROMOPRO-MS)
- Jessica Podda** 120  
**Design, sviluppo e test di usabilità di un'app per l'autovalutazione e il monitoraggio dei disturbi cognitivi nelle persone con sclerosi multipla: DIGICOG-MS**  
 Design, development and usability of a mHealth app for self-assessment and monitoring of cognitive impairment in people with Multiple Sclerosis: DIGICOG-MS
- Maria Pia Amato** 123  
**Riabilitazione cognitiva dell'attenzione, a domicilio con l'uso del computer, in soggetti con sclerosi multipla ad esordio pediatrico: uno studio pilota multicentrico**  
 Home-based, computer-assisted cognitive rehabilitation for attention in pediatric onset multiple sclerosis using a new dedicated software: a pilot multicenter study
- Giacinto Barresi** 126  
**ENACT: Impiegare soluzioni neuroergonomiche per attenuare il tremore cerebellare**  
 ENACT: Employing Neuroergonomic solutions to Attenuate the Cerebellar Tremor
- Daiana Bezzini** 129  
**Descrizione dell'aderenza alle principali campagne di medicina preventiva nelle persone con sclerosi multipla**  
 Description of adherence to the main preventive health campaigns of persons with multiple sclerosis
- SCLEROSI MULTIPLA PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS** 132
- Maria Pia Abbracchio, Ivano Eberini** 133  
**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, Marco Capobianco** 136  
**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
- VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS** 140
- Maria Pia Sormani** 141  
**Studio prospettico per valutare l'immunogenicità del vaccino antiSarsCov2 nella SM. CovaXiMS**  
 A prospective study for the evaluation of immunogenicity of anti-SARS-CoV2 vaccines in patients with Multiple Sclerosis. CovaxiMS: Covid-19 vaccine in Multiple Sclerosis

<b>Francesco Cucca</b>	<b>145</b>
<b>Impatto dei fattori genetici e dei farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla sulle risposte immunitarie cellulari e umorali dopo la vaccinazione contro il Sars-Cov-2</b>	
Impact of genetic factors and drugs used in the treatment of multiple sclerosis on cellular and humoral immune responses after vaccination against Sars-Cov-2: a pilot study in Sardinia	
<b>Francesco Cucca</b>	<b>149</b>
<b>Un approccio basato sulla genetica per identificare farmaci per la SM: sviluppo di brevetti dei geni candidati</b>	
A genetic toolbox in MS drug discovery: patent development of candidate genes	
<b>Federica Eva Esposito</b>	<b>153</b>
<b>Validazione e studio funzionale di varianti genetiche implicate nella risposta alla terapia con fingolimod</b>	
Validation and functional assessment of genetic variants implicated in the response to fingolimod treatment	
<b>Giuseppe Matarese, Luca Battistini</b>	<b>156</b>
<b>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</b>	
Caloric restriction as a novel therapeutic tool to manipulate immunity and improve therapeutic potential of first line drug treatments during relapsing remitting multiple sclerosis	
<b>Giovanni Ristori</b>	<b>161</b>
<b>Vaccino con bacillo di Calmette Guerin nella sindrome radiologicamente isolata</b>	
Bacille Calmette Guerin vaccine in radiologically isolated syndrome	
<b>Monica Ulivelli</b>	<b>165</b>
<b>Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasclerosi multipla, prevenibili da vaccino, e sicurezza dei vaccini, in una coorte di pazienti con sclerosi multipla. Studio multicentrico italiano</b>	
Immunisation status against major communicable diseases preventable with vaccines, and safety of vaccines, in a cohort of multiple sclerosis patients. An Italian multicenter study	
<b>DATA SHARING / DATA SHARING</b>	<b>169</b>
<b>NETWORK ITALIANO DI NEUROIMAGING (INNI)</b>	<b>170</b>
<b>PER L'OTTIMIZZAZIONE DELL'UTILIZZO DI TECNICHE AVANZATE DI RISONANZA MAGNETICA IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA</b>	
THE ITALIAN NEUROIMAGING NETWORK INITIATIVE (INNI) TO OPTIMIZE THE USE OF ADVANCED MRI TECHNIQUES IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS	
<b>Introduzione / Introduction</b>	<b>171</b>
<b>Massimo Filippi</b>	<b>174</b>
<b>Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica</b>	
Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice	
<b>Patrizia Pantano</b>	<b>178</b>
<b>L'impatto dei cambiamenti della connettività funzionale sulla progressione della malattia e l'accumulo di disabilità</b>	
The impact of functional connectivity changes on disease progression and disability accumulation	
<b>Nicola De Stefano</b>	<b>180</b>
<b>Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con sclerosi multipla</b>	
Large-scale, multi-centre assessment of hippocampal volume in multiple sclerosis patients	

<b>Gioacchino Tedeschi, Antonio Gallo</b>	<b>183</b>
<b>Predizione della performance cognitiva nei pazienti con sclerosi multipla utilizzando un approccio di intelligenza artificiale applicato ad un esteso data set multicentrico di immagini di risonanza magnetica</b>	
Prediction of the information processing speed performance in multiple sclerosis patients using a machine learning approach in a large multicenter magnetic resonance imaging data set	
<b>REGISTRO ITALIANO SCEROSI MULTIPLA</b>	<b>186</b>
<b>MULTIPLE SCLEROSIS ITALIAN REGISTER</b>	
<b>Indice / Index</b>	<b>187</b>
<b>Introduzione / Introduction</b>	<b>190</b>
<b>Progetti terminati / Ended projects</b>	<b>200</b>
<b>TERAPIA / THERAPY</b>	<b>200</b>
<i>Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta al trattamento</i>	<b>200</b>
<i>Prognostic factors and predictive models of treatment response</i>	
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<b>200</b>
<b>Predizione precoce di evoluzione sfavorevole in pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS). Studio RECIS (stima del rischio in CIS)</b>	
Early prediction of unfavorable evolution of clinically isolated syndrome (CIS) patients. The RECIS (risk estimate for CIS) study	
<b>Maria Pia Amato</b>	<b>202</b>
<b>Definizione dei predittori precoci clinici e di risonanza magnetica di risposta al trattamento nei pazienti con sclerosi multipla pediatrica</b>	
Assessing early clinical and MRI predictors of treatment response in pediatric multiple sclerosis patients	
<i>Efficacia del trattamento a breve e a lungo termine / Short and long-term treatment effectiveness</i>	<b>205</b>
<b>Damiano Paolicelli</b>	<b>205</b>
<b>Caratterizzare il rischio di eventi avversi gravi durante il sequencing dei trattamenti nei pazienti con Sclerosi Multipla: analisi di coorte basata sul Registro Italiano Sclerosi Multipla</b>	
PROfiling the risk of severe adverse events during sequencing therapies in patients with multiple sclerosis: an observational cohort analysis based on Italian Multiple Sclerosis Registry	
<b>Maria Trojano</b>	<b>208</b>
<b>Rete internazionale Big Multiple Sclerosis Data (BMSD)</b>	
Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network	
<i>Algoritmi di trattamento e switch / Treatment algorithms and switches</i>	<b>212</b>
<b>Maria Trojano</b>	<b>212</b>
<b>Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano Sclerosi Multipla per valutare l'impatto dell'attività di malattia nelle scelte terapeutiche durante le fasi recidivante e progressiva attiva di SM</b>	
EPID-MS Evaluation of the drivers of the therapy switch in active RRMS and active SPMS patients	
<i>Efficacia comparativa, sicurezza tra trattamenti / Comparative effectiveness, safety between treatments</i>	<b>217</b>
<b>Matilde Inglese</b>	<b>217</b>
<b>Trapianto di cellule staminali ematopoietiche in persone con sclerosi multipla progressiva secondaria attiva: uno studio comparativo con pazienti di controllo del Registro Italiano Sclerosi Multipla</b>	
Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Secondary Progressive Multiple Sclerosis: a comparative study with matched control patients from the Italian Multiple Sclerosis Register	

<i>Aderenza al trattamento / Treatment adherence</i>	<b>221</b>
<b>Antonio Gallo</b>	<b>221</b>
<b>Studio OCREVID: L'utilizzo di OCRElizumab durante la pandemia da coVID-19 in Italia</b>	
OCREVID Study: the management of OCRElizumab during the COVID-19 pandemic in Italy	
<b>EPIDEMIOLOGIA ANALITICA / ANALYTICAL EPIDEMIOLOGY</b>	<b>224</b>
<i>Fattori di rischio / Risk factors</i>	<b>224</b>
<b>Marco Capobianco</b>	<b>224</b>
<b>Attività di malattia nella sclerosi multipla e pandemia da SARS-COV2: studio di popolazione dal Registro Italiano Sclerosi Multipla (RISM)</b>	
Multiple sclerosis disease activity and SARS-COV2 pandemic: a population based study from the Italian MS Registry	
<b>PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2022, 2021</b>	<b>226</b>
FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2022, 2021	
<b>Comitato scientifico FISM 2022, 2021 / FISM Scientific Committee 2022, 2021</b>	<b>233</b>



**PROGETTI BANDO FISM  
TERMINATI NEL 2022**

FISM CALL PROJECTS  
ENDED IN 2022

---

---

# **Scoprire le cause della SM e i fattori di rischio**

Discovering the causes  
of MS and risk factors

---

# Mappatura fine e caratterizzazione funzionale dei loci associati alla SM per analizzare il ruolo patogenetico dei geni bersaglio dei farmaci



## Sandra D'Alfonso

*Dipartimento di Scienze della Salute, CAAD, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Umberto Dianzani, Nadia Barizzone, Nicola Pomella, Alessandro Pizzino, Endri Visha, Lucia Corrado, Fjorilda Caushi, Domizia Vecchio, Maurizio Leone**

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

**Federica Esposito, Ferdinando Clarelli, Melissa Sorosina, Massimo Filippi**, *Ospedale San Raffaele Unità di Neurologia e Centro SM, Laboratorio di Genetica Umana delle Malattie Neurologiche, Divisione di Neuroscienze, Università Vita-Salute San Raffaele, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia*

**Filippo Martinelli Boneschi, Alen Zollo, Andrea Corona**, *Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Milano, Milano, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Siamo a conoscenza dell'esistenza di 201 loci genetici al di fuori della regione HLA fortemente associati alla suscettibilità alla sclerosi multipla (SM) derivante da ampi studi GWAS (Genome Wide Association studies). Tuttavia, per la maggior parte di essi non è ancora chiaro il meccanismo funzionale specifico mediante il quale influenzano la patogenesi della SM. Solo per pochi geni come IL7, IL2RA, TNFRSF1A, TNFSF13B, TNFSF14, ulteriori studi di follow-up hanno identificato la variante causale e rivelato meccanismi patologici rilevanti. Il linkage disequilibrium (LD) rappresenta una limitazione di GWAS nell'individuare la probabile variante causale tra il gran numero di SNP associati, quindi sono necessari studi di mappatura fine.

L'obiettivo generale di questo progetto è eseguire una mappatura fine genetica e un follow-up funzionale dei loci associati alla SM derivati da GWAS per identificare il meccanismo funzionale alla base dei segnali di associazione GWAS. Per migliorare il potenziale traslazionale dei risultati del progetto, ci siamo concentrati sulle regioni

associate alla SM che comprendono i "geni bersaglio dei farmaci", vale a dire i geni che codificano per le proteine che sono bersaglio dei farmaci approvati negli studi clinici o dei farmaci sperimentali per le malattie umane.

Gli obiettivi specifici di questo progetto sono: 1) Identificare le varianti principalmente associate nelle regioni SM che comprendono i geni bersaglio dei farmaci. 2) Analizzare le potenziali varianti causali con esperimenti funzionali.

## RISULTATI

Obiettivo 1. Partendo da un'ampia coorte genotipizzata con piattaforme di array con un contenuto genome-wide di SNP (Single Nucleotide Polymorphism), per ottenere una mappa più densa di SNP per la successiva mappatura fine delle varianti causali putative, abbiamo eseguito l'imputazione del genotipo degli SNP genotipizzati nella piattaforma SNPs, contro il panel dell'Haplotype Reference Consortium. Abbiamo ottenuto una coorte finale di 5.903 persone (4.259 pazienti affetti da SM, 1.644 controlli sani) dalla popolazione italiana continentale con

6.339.414 SNP imputati che coprono l'intero genoma. Per mappare le regioni SM significativamente replicate ( $p < 0,05$ ) nella nostra coorte italiana con presunti geni bersagli di farmaci, abbiamo utilizzato il database Drug-Gene Interaction v4.2 (DGIdb, con oltre 100.000 interazioni farmaco-gene) e ottenuto 36 regioni circostanti i nostri SNP replicati con un totale di 238 geni bersagli di farmaci. È stata eseguita una mappatura fine di queste 36 regioni per districare l'effetto LD dall'associazione statistica tra SNP e SM e per inferire la causalità, utilizzando due strumenti bioinformatici (Paintor e CaviarBF) basati sull'analisi bayesiana, che assegnano una probabilità a posteriori di causalità (o a posteriori probabilità di inclusione, PIP) a un SNP in ciascuna regione, tenendo conto della rilevanza biologica di una variante per migliorare la mappatura fine. Abbiamo utilizzato i punteggi GWAVA, CADD e FINSURF per dare la priorità agli SNP in base alla loro rilevanza biologica. Per 11 regioni, Paintor e CaviarBF hanno dato la priorità ad almeno 1 SNP con evidenza di causalità (PIP  $> 0,75$ ). Per identificare il gene putativo la cui funzione è influenzata dagli SNP con evidenza di causalità, abbiamo utilizzato lo strumento Open Targets Genetics e abbiamo scoperto che 5 di questi SNP prendono di mira un gene bersaglio del farmaco.

Obiettivo 2. Durante lo sviluppo del progetto abbiamo deciso di cambiare il piano originale per gli studi funzionali passando da un'analisi funzionale approfondita di sole 1-2 varianti ad un'analisi sistematica di tutte le varianti mappate in una regione SM in alto linkage disequilibrium con il SNP che mostra l'associazione più significativa (il cosiddetto "lead SNP") sfruttando la recente introduzione di un test in vitro di screening ad alto rendimento, Massively Parallel Reporter Assay (MPRA), in grado di testare sistematicamente fino a migliaia di sequenze per il loro presunto ruolo di regolazione della trascrizione (come promotore o potenziatore) all'interno di un singolo saggio in vitro in diverse linee cellulari. Abbiamo applicato il metodo MPRA a 5 regioni SM e testato il presunto ruolo di regolazione della trascrizione come promotore o potenziatore, in due diverse linee cellulari (HEK293T e SHSY5Y), su un totale di 86 SNP. Per 4 regioni, le analisi MPRA hanno identificato almeno un SNP che influenza l'espressione genica di un gene bersaglio del farmaco.

Complessivamente, per 9 regioni SM, il nostro approccio ci ha permesso di individuare lo SNP con un potenziale ruolo primario nell'associazione SM e con prove in vitro e/o in silico di implicazioni funzionali su un gene bersaglio di farmaci.

Tra i risultati che mostrano le migliori implicazioni potenziali per un ulteriore follow-up, abbiamo dimostrato che tra i 12 SNP che mostrano un LD elevato ( $> 0,77$ ) con l'SNP principale (rs6032662) della regione SM sul cromosoma 20, le analisi MPRA hanno mostrato che 2 SNP hanno mostrato un'influenza significativamente diversa ( $FDR < 0,01$ ) sull'espressione genica delle due varianti alleliche. Questi SNP mappano 6.714 bp e 72 bp (5'UTR) a monte del TSS del gene CD40 e i risultati del database target aperto suggeriscono che CD40 rappresenti effettivamente il gene bersaglio di entrambi gli SNP poiché influenzano l'espressione della proteina CD40 (pQTL), l'RNA CD40 (eQTL) e l'espressione dell'isoforma CD40 (sQTL) e mappano nei siti di legame dei fattori di trascrizione. Gli stessi SNP influenzano l'espressione di diversi tratti immunologici come il numero di diversi sottoinsiemi di cellule B. Pertanto, sulla base di questi risultati, si è tentati di ipotizzare che le varianti associate alla SM mappano nella regione genomica in grado di influenzare la trascrizione del CD40 e quindi la sua proteina e quindi una sovrapproduzione geneticamente influenzata di CD40 sia associata alla suscettibilità alla SM. Il recettore CD40 e il ligando CD40L sono proteine transmembrana che appartengono alla superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF) e sono fondamentali per l'inizio e la persistenza della risposta infiammatoria. È interessante notare che il CD40 è un bersaglio del farmaco Iscalimab, un anticorpo con azione inibitrice del CD40 utilizzato negli studi clinici di fase II (ChEMBL4298210) in diverse malattie autoimmuni (diabete di tipo 1, LES, miastenia grave, malattia di Graves, artrite reumatoide, sindrome di Sjogren).

## CONCLUSIONI

Per 9 regioni SM, il nostro approccio ci ha permesso di individuare lo SNP con un potenziale ruolo primario nell'associazione SM e con prove *in vitro* e/o *in silico* di implicazioni funzionali su un gene bersaglio di farmaci. Questi risultati promettenti necessitano di un'ulteriore convalida con approcci in silico e in vitro e hanno potenziali implicazioni sulla conoscenza dei meccanismi patologici e di nuovi bersagli farmacologici. Inoltre, questo progetto ha permesso di allestire un ampio set di dati dalla popolazione italiana con una fitta mappa di marcatori genetici genome-wide, una risorsa preziosa per futuri progetti di ricerca del meccanismo patogenetico della suscettibilità alla SM e per testare il contributo genetico sulla SM fenotipi clinici.

# Fine mapping and functional characterization of MS associated loci to dissect the pathogenetic role of drug target genes

## INTRODUCTION AND AIMS

We are aware of the existence of 201 genetic loci outside the HLA region robustly associated to MS susceptibility deriving from large GWAS (Genome Wide Association studies). However, for most of them the specific functional mechanism by which they influence MS pathogenesis is still unclear. Only for a few genes as IL7, IL2RA, TNFRSF1A, TNFSF13B, TNFSF14, additional follow-up studies identified the causal variant and revealed relevant disease mechanisms. Linkage disequilibrium (LD) represents a limitation of GWAS in pinpointing the likely causative variant among the large number of associated SNPs, thus fine-mapping studies are required.

The GENERAL AIM of this project is to perform a genetic fine mapping and functional follow up of MS associated loci derived from GWAS to identify the functional mechanism underlying the GWAS association signals.

To enhance the translational potential of the project findings, we have focused on MS associated regions encompassing “drug target genes”, namely genes encoding for proteins that are target of drugs approved in clinical trials or experimental drugs for human diseases.

The specific aims of this project are: 1) To identify the primarily associated variants in MS associated regions encompassing drug target genes. 2) To analyse the potential causal variants with functional experiments.

## RESULTS

AIM1. Starting from a large cohort genotyped with array platforms with a genome-wide content of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), to obtain a denser map of SNPs for subsequent fine mapping of putative causal variants, we performed genotype imputation of the SNPs genotyped in the SNPs platform, against the Haplotype Reference Consortium panel. We obtained a final cohort of 5,903 persons (4,259 MS patients, 1,644 healthy controls) from the continental Italian population with 6,339,414 bona-fide imputed SNPs spanning the entire genome. To cross-map MS regions significantly replicated ( $p < 0.05$ ) in our Italian cohort with putative druggable genes, we used the Drug-Gene Interaction database v4.2 (DGIdb, with over 100,000 drug-gene interactions), and obtained 36 regions surrounding our replicated SNPs with a total of 238 druggable genes (range 1-23 drug target genes per region).

Fine mapping of these 36 regions was performed to disentangle the LD effect from the statistical association between SNPs and MS and to infer causality, using two bioinformatic tools (Paintor and CaviarBF) based on Bayesian

analysis, which assign a posterior probability of causality (or posterior inclusion probability, PIP) to a SNP in each region, while taking into account the biological relevance of a variant to improve fine mapping (functionally informed fine mapping). We used GWAVA, CADD and FINSURF scores to prioritize SNPs according to their biological relevance. For 11 regions, Paintor and CaviarBF prioritized at least 1 SNP with evidence of causality (PIP  $> 0.75$ ). To identify the putative gene whose function is influenced by the SNPs with evidence of causality, we utilized Open Targets Genetics tool and found that 5 of these SNPs target a drug target gene.

AIM2. During the development of the project we decided to change the original plan for the functional studies moving from a deep functional analysis of only 1-2 variants to a systematic analysis of all the variants mapping in a MS region in high linkage disequilibrium with the SNP showing the highest significant association (the so-called “lead SNP”) taking advantage of the recent introduction of a high-throughput screening in vitro assay, Massively Parallel Reporter Assay (MPRA), able to systematically test up to thousands of sequences for their putative transcription regulation role (such as promoter or enhancer) within a single in vitro assay in different cell lines. We applied the MPRA method to 5 MS regions and tested the putative transcription regulation role as promoter or enhancer, in two different cell lines (HEK293T and SHSY5Y), of a total of 86 SNPs. For 4 regions, MPRA analyses identified at least one SNP influencing gene expression of a drug target gene.

Altogether, for 9 MS regions, our approach allowed us to pinpoint the SNP with a potential primary role in MS association and with in vitro and/or in silico evidence of functional implications on a drug target gene.

Among the results showing the best potential implications for further follow-up, we showed that among the 12 SNPs showing a high LD ( $> 0.77$ ) with the lead SNP (rs6032662) of the MS region on chromosome 20, MPRA analyses showed that 2 SNPs showed a significantly different influence (FDR  $< 0.01$ ) on gene expression of the two allelic variants. These SNPs map 6,714bp and 72bp (5'UTR) upstream the TSS of the CD40 gene and the results of the open target database propose that CD40 actually represents the target gene of both SNPs since they influence the expression of CD40 protein (pQTL), CD40 RNA (eQTL) and CD40 isoform expression (sQTL), and map in binding sites of transcription factors. The same SNPs influence the expression of different immunological traits such as the number of different B cell subsets. Thus, based on these

results it is tempting to speculate that the MS-associated variants map in genomic region able to influence the transcription of CD40 and hence its protein and thus a genetically influenced overproduction of CD40 are associated with MS susceptibility. The CD40 receptor and CD40L ligand are transmembrane proteins that belong to the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily and are critical to the initiation and persistence of the inflammatory response. Interestingly, CD40 is a target of the drug Iscalimab, an antibody with inhibitor action on CD40 utilized in phase II clinical trials (CHEMBL4298210) in different autoimmune diseases (type 1 diabetes, SLE, Myasthenia gravis, Graves disease, rheumatoid arthritis, Sjogren syndrome).

## CONCLUSIONS

For 9 MS regions, our approach allowed us to pinpoint the SNP with a potential primary role in MS association and with *in vitro* and/or *in silico* evidence of functional implications on a drug target gene.

These promising results need further validation with *in silico* and *in vitro* approaches, and they have potential implication on the knowledge of disease mechanisms and novel drug target. In addition, this project allowed to set up a large data set from the Italian population with a dense map of genome-wide genetic markers, a valuable resource for future project searching for the pathogenetic mechanism of MS susceptibility and for testing the genetic contribution on MS clinical phenotypes.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/Publications

- Barizzzone N, Cagliani R, Basagni C, Clarelli F, Mendozzi L, Agliardi C, Forni D, Tosi M, Mascia E, Favero F, Corà D, Corrado L, Sorosina M, Esposito F, Zuccalà M, Vecchio D, Liguori M, Comi C, Comi G, Martinelli V, Filippi M, Leone M, Martinelli-Boneschi F, Caputo D, Sironi M, Guerini FR, D'Alfonso S. An Investigation of the Role of Common and Rare Variants in a Large Italian Multiplex Family of Multiple Sclerosis Patients. *Genes (Basel)*. 2021 Oct 13;12(10):1607. doi: 10.3390/genes12101607
- Zuccalà M, Barizzzone N, Boggio E, Gigliotti L, Sorosina M, Basagni C, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Vecchio D, Corsetti E, Martire S, Perga S, Ferrante D, Gajofatto A, Ivashynka A, Solaro C, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Filippi M, Esposito F, Leone M, De Bellis G, Dianzani U, Martinelli-Boneschi F, D'Alfonso S. Genomic and functional evaluation of TNFSF14 in multiple sclerosis susceptibility. *J Genet Genomics*. 2021 Jun 20;48(6):497-507. doi: 10.1016/j.jgg.2021.03.017
- Mascia E, Clarelli F, Zauli A, Guaschino C, Sorosina M, Barizzzone N, Basagni C, Santoro S, Ferrè L, Bonfiglio S, Biancolini D, Pozzato M, Guerini FR, Protti A, Liguori M, Moiola L, Vecchio D, Bresolin N, Comi G, Filippi M, Esposito F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F. Burden of rare coding variants in an Italian cohort of familial multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2022 Jan 15;362:577760. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577760
- Clarelli F, Barizzzone N, Mangano E, Zuccalà M, Basagni C, Anand S, Sorosina M, Mascia E, Santoro S, PROGEMUS; PROGRESSO; Guerini FR, Virgilio E, Gallo A, Pizzino A, Comi C, Martinelli V, Comi G, De Bellis G, Leone M, Filippi M, Esposito F, Bordoni R, Martinelli Boneschi F, D'Alfonso S. Contribution of Rare and Low-Frequency Variants to Multiple Sclerosis Susceptibility in the Italian Continental Population. *Front Genet*. 2022 Jan 3;12:800262. doi: 10.3389/fgene.2021.800262
- Sorosina M, Barizzzone N, Clarelli F, Anand S, Lupoli S, Salvi E, Mangano E, Bordoni R, Roostaei T, Mascia E, Zuccalà M, Vecchio D, Cavalla P, Santoro S, Ferrè L, Zollo A; PROGEMUS; Barlassina C, Cusi D, Martinelli V, Comi G, Leone M, Filippi M, Patsopoulos NA, De Jager PL, De Bellis G, Esposito F, D'Alfonso S, Martinelli Boneschi F. A multi-step genomic approach prioritized TBKBP1 gene as relevant for multiple sclerosis susceptibility. *J Neurol*. 2022;269:4510-4522

### Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations

- M. Zuccalà\*, A. Pizzino N\* Barizzzone, F Clarelli, C Basagni, M Sorosina, E Mascia, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, D Vecchio, M Pozzato, C Comi, R Cantello, V Martinelli, G. Comi, M Leone, M Filippi, Esposito, F Martinelli- Boneschi, S D'Alfonso. Italian Society of Human Genetics. SIGU, November 2020. Winner of the SIGU Prize "Best Poster for complex diseases"



- M Zuccalà\*, A Pizzino\*, N Barizzone, F Clarelli, C Basagni, M Sorosina, E Mascia, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, D Vecchio, M Pozzato, C Comi, R Cantello, V Martinelli, G Comi, M Leone, M Filippi F Martinelli-Boneschi, F Esposito, S D'Alfonso. *Network biology approaches in multiple sclerosis for drug repurposing opportunities*. European Society of Human Genetics, ESHG August 2021. Poster
- Lucia Corrado, Fjorilda Caushi\*, Endri Visha, Beatrice Piola, Erica Melone, Diego Cotella, Laura Follia, Martina Tosi, Alessandro Pizzino, Ferdinando Clarelli, Domizia Vecchio, Massimo Filippi, Federica Esposito, Martinelli Boneschi Filippo Giovanni, Maurizio Leone, Nadia Barizzone, Sandra D'Alfonso. *Fine mapping and functional analysis through Massively Parallel Reporter Assay of MS susceptibility regions containing drug target genes*. European Society of Human Genetics, ESHG 2022. Poster
- Endri Visha, Nicola Pomella, Ferdinando Clarelli, Lucia Corrado, Alessandro Pizzino, Fjorilda Caushi, Beatrice Piola, Erica Melone, Diego Cotella, Laura Follia, Martina Tosi, Domizia Vecchio, Massimo Filippi, Maurizio Leone, Martinelli Boneschi Filippo Giovanni, Federica Esposito, Nadia Barizzone, Sandra D'Alfonso. *Beyond Genome wide association studies (GWAS) in multiple sclerosis (MS): fine mapping and functional analysis in MS susceptibility regions containing drug target genes* European Society of Human Genetics (ESHG 2023)

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 200.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 200,000

# I genotipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla ed i loro ruolo funzionale nell'eziologia della malattia



## Rosella Mechelli

Dipartimento di Scienze Umane e Promozione della Qualità della Vita, Università San Raffaele  
Roma, Roma Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS - UNITÀ 1 SAN RAFFAELE-SAPIENZA

**Grazia Manfrè, Sara Ilari, Miriam Casali**, Università San Raffaele and IRCCS San Raffaele Roma, Roma Italia

**Renato Umeton**, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA

**Maria Chiara Buscarinu, Giovanni Ristori, Marco Salvetti**, Sapienza Università di Roma/Azienda Ospedaliera Universitaria S. Andrea, Roma, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS - UNITÀ 2 IBIOM-CNR

**Mariangela De Robertis, Caterina Manzari**, Istituto di Biomembrane, Bioenergetica e Biotecnologie Molecolari, CNR, Bari, Italia

**Matteo Chiara**, Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

**Annamaria D'Erchia, Luigi Mansi, Ernesto Picardi, Graziano Pesole**, Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologia e Biofarmaceutica, Università degli studi di Bari "A. Moro", Bari, Italia

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

**Eleonora Cocco, Lorena Lorefice**, Centro Regionale per la diagnosi e la cura della sclerosi multipla ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

**Antonio Bertolotto, Marco Capobianco, Fabiana Marnetto, Paola Valentino**, CReSM, Azienda Ospedaliera S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

**Diego Centonze\*, Girolama Marfia, Maura Castelli**, Multiple Sclerosis Clinical and Research Unit, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Tor Vergata, Roma

\*IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) Neuromed, Pozzilli, IS

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è uno dei fattori ambientali associati all'insorgenza della sclerosi multipla (SM). È stato recentemente dimostrato il ruolo causale del virus, ma rimangono ancora da chiarire i meccanismi attraverso cui esso partecipa all'insorgenza della SM. Abbiamo individuato un allele del DNA virale, chiamato 1.2, che si associa con un maggior rischio di insorgenza della SM. Questo si trova nella regione che codifica per la proteina EBNA2, un fattore di trascrizione in grado di modificare i livelli dell'espressione sia di geni virali che cellulari. Inoltre, in uno studio esplorativo abbiamo sequenziato i genomi di EBV derivati da linee cellulari linfoblastoidi spontanee (sPLCL) ottenute da persone con SM e da donatori sani (HD), individuando altre varianti virali che potrebbero essere correlate con la SM.

L'obiettivo del progetto era di confermare l'associazione dell'allele EBNA2-1.2 con la SM in un'ampia popolazione, definendone anche il possibile ruolo funzionale, e di individuare altre possibili varianti genomiche correlate con la SM.

## RISULTATI

Duecentonovanta persone con SM (libere da terapie immunomodulanti) e 155 HD di pari età e sesso, sono stati sottoposti a prelievo ematico da cui sono state isolate le cellule B (potenzialmente infettate dal virus). Il DNA è stato analizzato tramite digital droplet PCR (ddPCR) che ci ha permesso di identificare le varianti del genoma virale utilizzando specifiche sonde fluorescenti disegnate sul gene EBNA2 (1.2, 1.3B, 1.3A e B95-8) e su altri geni virali. L'analisi dei dati ha confermato l'associazione tra l'alle-

le 1.2 e la SM (24% nel gruppo con SM vs 4% nel gruppo HD;  $p=0.0001$ ) e una maggiore frequenza di co-infezioni di diversi alleli nel gruppo con SM (9% e 2,6% nel gruppo HD;  $p=0.01$ ). Non sono state osservate differenze nella frequenza degli alleli 1.3B (21% nel gruppo SM e 24% nel gruppo HD), 1.3A (6% in entrambe le popolazioni) e B95-8 (5% nel gruppo SM e 8% nel gruppo HD). Inoltre, nel 52% dei controlli analizzati e nel 34% degli SM non è stato possibile identificare gli alleli di EBNA2 ( $p=0.0004$ ), suggerendo che il numero di copie virali presenti nei controlli sia ridotto e confermando dati di letteratura che mostrano un'alterazione nella capacità di controllare l'infezione da parte di persone con SM.

Per studiare il possibile ruolo funzionale delle varianti di EBNA2, sono stati valutati i livelli di espressione dei geni cellulari in spLCLs ottenute da persone con SM ed infettate dall'allele di rischio (1.2,  $n=5$ ) e da altri alleli non predisponenti ed identificati nella popolazione generale (1.3B,  $n=4$  e B95-8,  $n=4$ ). Sono stati sequenziati gli RNA messaggeri delle spLCLs, individuando geni differentemente espressi tra le varie condizioni, ed appartenenti al pathway dell'AMP ciclico ed ai processi di attivazione dei linfociti B, osservando anche una ridotta espressione di alcuni RNA non codificanti nelle spLCLs che esprimono l'allele 1.2. Tra i geni differentemente espressi abbiamo selezionato e validato, su una popolazione indipendente di spLCLs, plexin-D1 (PLXND1) ed il recettore 4 della prostaglandina E (PTGER4), mostrando che le varianti del gene EBNA2 sono in grado di modulare l'espressione di geni cellulari, probabilmente attraverso un'alterata espressione di RNA non codificanti.

Per studiare la variabilità genetica di altre regioni del genoma di EBV, abbiamo selezionato ed analizzato 4 varianti su altrettanti geni virali: LMP1, BPLF1, BCRF2 e BHLF1, che intervengono nelle diverse fasi dell'infezione. Tra queste, la variante selezionata su BHLF1 ha mostrato una più alta frequenza nel gruppo SM rispetto ai controlli (è presente nel 12% dei pazienti ed in nessuno dei controlli analizzati,  $p=0.0015$ ).

Nel complesso sono stati raggiunti gli obiettivi che ci eravamo proposti, confermando l'associazione tra l'allele 1.2 e la SM ed individuandone un possibile ruolo funzionale nell'alterazione di processi legati all'attivazione dei linfociti B. Inoltre, la variante del gene virale BHLF1, più frequente nei campioni di persone con SM, conferma la nostra ipotesi che altre regioni del genoma virale possono alterare l'interazione tra virus ed ospite.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo progetto rafforzano l'ipotesi che la genetica del virus di EBV possa avere un ruolo nell'interazione virus-ospite nella SM, partecipando all'alterazione dei meccanismi dedicati a tenere sotto controllo l'infezione. Confermare e chiarire il ruolo delle varianti genetiche di EBV nella eziopatogenesi della SM porterebbe due vantaggi principali nella cura dei pazienti: l'utilizzo di un approccio terapeutico eziologico, con antivirali specifici che bersagliano i meccanismi cellulari alterati dagli alleli di rischio e lo sviluppo di protocolli di valutazione del rischio, eventualmente da integrare con altri biomarcatori di laboratorio e di risonanza magnetica.

# Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis and their functional relevance in the disease etiology

## INTRODUCTION AND AIMS

Recent findings strongly support the causal role of Epstein-Barr virus (EBV) infection in multiple sclerosis (MS), even if the underlying mechanisms are still debated. In an exploratory study, we identified an EBV nuclear antigen 2 (EBNA2) allele that associate with MS. By a complete sequencing of EBV genome, obtained from spontaneously growing EBV transformed B cell lines (spLCLs) from people with MS (pwMS) and controls, we discovered new possible MS-related EBV variants. Our purpose, was to confirm the data on EBNA2-1.2 allele in a larger and independent population, to study its possible functional relevance in a MS context, and to ascertain the statistical significance of other possible MS-associated EBV genomic variants.

## RESULTS

We enrolled 290 pwMS, free from disease modifying therapies, and 155 age-sex matched healthy donors (HD).

DNAs obtained from selected B cells were analysed using digital droplet PCR (ddPCR), that is fast and affordable to screen on large cohorts. We set up fluorescent custom assays able to identify single variants or variants combinations within EBNA2 gene (1.2, 1.3B, 1.3A and B95-8 EBNA2 alleles) and other EBV regions.

We confirmed the association of EBNA2-1.2 allele with MS (24% of infected pwMS vs 4% of HD;  $p=0.0001$ ) and the coexistence of two or more EBNA2 alleles in the 9% of pwMS and in the 2,6% of HD ( $p=0.01$ ). No significant differences were observed in either 1.3B allele (21% in pwMS and 24% in HD), 1.3A (6% in both groups) and B95-8 allele (5% in pwMS and 8% in HD). Moreover,

we obtained a percentage of undetectable samples in both groups, due to the low number of EBV-infected B cells in peripheral blood: we obtained 34% of undetectable samples in pwMS and 52% in HD ( $p=0.0004$ ), suggesting that pwMS have a higher number of EBV genome copies respect to the HD. To find out a possible functional relevance of MS-associated EBNA2 allele, we evaluated the gene expression profile of spLCLs infected by the risk (1.2) and non-risk alleles (1.3B and B95-8). We sequenced the total RNA of 5 spLCL carrying the 1.2 allele, 4 carrying the 1.3B allele and 4 carrying the B95-8. Comparing the three groups we showed a dysregulation of cellular functions belonging to the cAMP signaling pathway, B cell activation and antigen presentation and a down-regulation of non-coding RNAs in spLCLs carrying the MS-associated EBNA2 allele (1.2). Among the dysregulated genes, we selected and validated the expression level of plexin-D1 (PLXND1) and prostaglandin E receptor 4 (PTGER4) in an independent cohort of spLCLs. To study the genetic variability of other regions of the EBV genome in peripheral blood of pwMS and HD, we selected single nucleotide variants in viral genes involved in both latent (LMP1) and lytic phase (BPLF1 and BHLF1) and with unknown function (BCRF2). No signi-

ficant differences were observed in LMP1, BPLF1 and BCRF2, while the variant selected within the BHLF1 gene was found in 12% of pwMS and in none of the controls ( $p=0,0015$ ).

Our findings confirm the association of the 1.2 EBNA2 allele and MS and disclose a new variant in BHLF1 that is more frequent in MS, reinforcing the idea that EBV variants may have a role in the dysregulation of virus-host interaction in MS.

## CONCLUSIONS

Overall our findings reinforce the idea that EBV variants may have a role in the virus-host interaction in MS, participating in the alteration of mechanisms devoted to keep in check the infection and suggesting a possible involvement of non-coding RNAs in these processes.

Confirming and clarifying the role of EBV genetic variants in the etio-pathogenesis of MS would bear two major advantages in the cure of patients: proximity to an etiologic approach, that may also be specific for the cellular pathway/molecules dysregulated by the risk variants, and the development of risk-assessment protocols, possibly to be integrated with other laboratory and neuroimaging bio-markers.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- XXIX Congresso della Società Italiana di Neuroimmunologia (AINI) Verona September 16 - 19, 2021
- 20th International Symposium on Epstein-Barr virus associated diseases; Siena July 3-6, 2022
- ACTRIMS forum 2023, San Diego, California February 23-25, 2023

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 15 mesi) e l'ammontare di 180.550€**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 15 months) and the amount of € 180,550

# Basi molecolari dell'associazione tra la SM e l'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr



## Marco Patrone

Unità di Biocristallografia, Divisione di Trapianti, Immunologia e Malattie infettive, Fondazione Centro San Raffaele, Milano, Italia

MENTORE/MENTOR

**Massimo Degano**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è presente nel 90% della popolazione ed è fortemente collegato al rischio di sviluppare la sclerosi multipla (SM). Infatti, negli individui che hanno avuto la mononucleosi infettiva -causata dalla forma acuta dell'infezione primaria- la probabilità di sviluppare successivamente SM raddoppia. Lo stretto legame tra questo virus e la malattia autoimmune è emerso da numerosi studi epidemiologici, ma manca ancora un modello meccanicistico che spieghi il legame tra uno dei virus umani più diffusi al mondo alla predisposizione in alcuni individui infetti. Dopo la fase acuta, EBV entra in latenza nei linfociti B (le cellule che producono gli anticorpi) e ne sovverte profondamente il comportamento, al punto da ridurre la capacità di queste cellule di distinguere tra i componenti dell'organismo e gli antigeni estranei. Si sospetta che i linfociti B infettati in forma latente da EBV forniscano gli stimoli molecolari che inducono altri linfociti, le cellule T, ad aggredire la mielina, una sostanza di rivestimento necessaria per la trasmissione nervosa e per la sopravvivenza dei neuroni stessi. La proteina virale EBNA2 è il regolatore del programma genetico della latenza di EBV nei linfociti B. Proprio varianti naturali di EBNA2 (identificate nei laboratori dell'Università Sapienza di Roma diretti dai Dott. Marco Salvetti e Giovanni Ristori) mostrano un gradiente di associazione con SM, dal rischio alla protezione ed in particolare la variante EBNA2 1.2 risulta maggiormente presente nei pazienti con SM. EBNA2 necessita di una proteina umana, chiamata RBPJ, per la sua azione. Il nostro progetto continua un programma già avviato finanziato da FISM di studio biochimico e molecolare con tecniche ad alta risoluzione dell'interazione tra queste due proteine per comprendere gli effetti che le varianti naturali di EBNA2 hanno sul legame con RBPJ. Lo scopo è di svelare i fenomeni molecolari alla base delle evidenze statistiche e raccogliere dati utili allo sviluppo di test diagnostici precoci e di nuove terapie mirate.

### RISULTATI

L'analisi comparata delle varianti naturali di EBNA2 associate e non associate a SM ha evidenziato che le attività biochimiche di base di questa proteina virale non divergono nella forma correlata con SM. Infatti, l'interazione fisica di EBNA2 con il suo partner cellulare RBPJ, la capacità di attivare geni ricombinanti, così come il riconoscimento di sequenze specifiche di DNA non sono influenzate dalla particolare variante di EBNA2. L'avvento recente dell'intelligenza artificiale nel campo della biologia strutturale ha anche permesso di ottenere un calcolo predittivo della formula di struttura di EBNA2, da cui si deduce che questa proteina virale è altamente flessibile e non possiede una conformazione definita autonoma. Questa caratteristica giustifica l'impossibilità di ottenere una forma cristallina che sia suscettibile all'uso della diffrazione ai raggi X per lo studio del legame di EBNA2 con RBPJ nel dettaglio atomico. Infatti, i numerosi tentativi effettuati di ottenere cristalli del complesso EBNA2-RBPJ sono stati frustrati dal disordine strutturale di EBNA2. A causa di queste difficoltà, è stato esplorato un altro approccio per lo studio strutturale di EBNA2, l'elettromicroscopia criogenica. A tale scopo, EBNA2 è stata prodotta da colture di cellule umane, per fornire un insieme più completo di interattori cellulari che potessero limitare l'entropia di EBNA2 stessa. Si è, però, riscontrata una inconsistenza delle preparazioni sperimentali che ha, finora, impedito lo sviluppo di una procedura affidabile utile alla caratterizzazione dei complessi molecolari. Questa variabilità potrebbe essere causata dalla natura adesiva di EBNA2 che si manifesta nella formazione di condensati molecolari intracellulari. Nonostante questi ostacoli tecnici, è emersa una differenza rilevante nel comportamento biofisico tra le varianti di EBNA2 associate e non associate a SM. Diversamente dalla forma non associata a SM, EBNA2 1.2 non mostra la tendenza a formare fibrille amiloidi in seguito a stress meccanico dei condensati e correla con la capacità di cellu-

le che esprimono EBNA2 1.2 di eseguire una corretta chemiotassi. Questo risultato è interessante, poiché lo stress meccanico si produce spontaneamente nelle cellule in movimento, come ad esempio nei linfociti B attivati da un auto-antigene. Il formarsi degli amiloidi EBNA2 impedirebbe alle cellule B di rispondere ad uno stimolo chemiotattico, mentre la loro assenza consentirebbe con maggiore frequenza l'attivazione della risposta auto-immune.

## CONCLUSIONI

La determinazione nel portare avanti uno studio caratterizzato da numerosi ostacoli tecnici ha fornito un primo indizio sulle cause della distribuzione epidemiologica non omogenea di varianti di EBNA2 tra pazienti SM e individui sani, avvicinandoci alla comprensione del ruolo di EBV nel predisporre allo sviluppo di SM.

# Dissecting the molecular link between MS and Epstein-Barr nuclear antigen 2

## INTRODUCTION AND AIMS

Epstein-Barr virus (EBV) is present in 90% of the population and is strongly linked to the risk of developing multiple sclerosis (MS). Indeed, previous infectious mononucleosis - caused by the acute form of the primary infection - doubles the probability to develop MS. The close link between this virus and the autoimmune disease has emerged from numerous epidemiological studies, but a mechanistic model for the association between one of the most widespread human viruses and the predisposition to MS is still missing. After the acute phase, EBV goes into latency in B lymphocytes (the cells that produce antibodies) and profoundly disrupts their behavior, to the point of reducing the ability of these cells to distinguish between body components and foreign antigens. Latently infected B lymphocytes with EBV are suspected to provide the molecular stimuli that induce other lymphocytes, the T cells, to attack myelin, a coating substance necessary for nerve transmission and for the survival of neurons themselves. The viral protein EBNA2 is the regulator of the genetic program of EBV latency in B lymphocytes. Natural variants of EBNA2 (identified by Rosella Mechelli, Marco Salvetti and Giovanni Ristori at Università Sapienza in Rome) show a gradient of association with MS, from risk to protection and in particular the EBNA2 1.2 variant is more present in patients with MS. EBNA2 requires a human protein, called RBPJ, for its action. This project continues an already started program funded by FISM for the biochemical and molecular study with high resolution techniques of the interaction between these two proteins to understand the effects that the natural variants of EBNA2 have on the binding with RBPJ. The aim is to reveal the molecular phenomena underlying the statistical evidence and to collect data useful for the development of early diagnostic tests and new targeted therapies.

## RESULTS

Comparative analysis of MS-associated and -not associated natural variants of EBNA2 showed that the basic biochemical activities of this viral protein do not diverge in the MS-related form. Indeed, the physical interaction of EBNA2 with its cellular partner RBPJ, the ability to activate recombinant genes, as well as the recognition of specific DNA sequences are not affected by the EBNA2 variant. The recent advent of artificial intelligence in the field of structural biology has also made it possible to obtain a predictive computing for the EBNA2 structural formula, showing that this viral protein is highly flexible and does not have a defined autonomous conformation. This characteristic explains the impossibility of obtaining a crystalline form that was susceptible to the use of X-ray diffraction for the study of the EBNA2 interaction with RBPJ in atomic detail. In fact, numerous attempts to obtain crystals of the EBNA2-RBPJ complex have been frustrated by the structural disorder of EBNA2. Due to these difficulties, another approach for the structural study of EBNA2, namely cryogenic electron-microscopy, has been explored. For this purpose, EBNA2 was produced in recombinant form from human cell cultures, with the idea of providing a more complete set of cellular interactors that could limit the entropy of EBNA2 itself. However, the experimental preparations have been found inconsistent preventing, so far, the development of a reliable protocol for the characterization of the molecular complexes. This variability could be caused by the adhesive nature of EBNA2 which turns in the assembly of intracellular molecular condensates. Despite these technical hurdles, a relevant difference in biophysical behavior emerged between MS-associated and -not associated EBNA2 variants. Unlike the form not associated with MS, the EBNA2 1.2 variant does not form amyloid fibrils following mechanical

stress of the condensates and correlated with the ability of EBNA2 1.2-expressing cells to properly perform chemotaxis. This result is striking, as mechanical stress occurs spontaneously in moving cells, such as in B lymphocytes activated by a self-antigen. The amyloids by MS-non-associated EBNA2 would prevent cells from responding to chemotaxis, while their absence might allow cells to undergo more frequently the activation of the auto-immune response.

## CONCLUSIONS

The commitment to proceed with this study in spite of the several and severe technical drawback provided the first clue into the causes of the uneven epidemiological distribution of EBNA2 variants between MS patients and healthy individuals, bringing us closer to understanding the role of EBV in predisposing to the development of MS.



# Infezioni da herpesvirus in pazienti con sclerosi multipla positivi per KIR2DL2: meccanismi che attivano l'autoimmunità



## Roberta Rizzo

*Dipartimento Scienze Chimiche, Farmaceutiche e Agrarie, Università degli Studi di Ferrara, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Daria Bortolotti, Valentina Gentili, Antonella Rotola**

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

**Dario Di Luca, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara, Italia**

**Clara Ballerini, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Italia**

**Enrico Fainardi, Neuroradiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze, Italia**

**Eleonora Baldi, Luisa Maria Caniatti, UOC Neurologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Ferrara, Italia**

**Maura Pugliatti, Massimiliano Castellazzi, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Sezione di Scienze neurologiche, psichiatriche e psicologiche, Clinica Neurologica Università degli Studi di Ferrara, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Recenti osservazioni suggeriscono che l'immunità innata, e in particolare le cellule Natural Killer (NK), possa essere un fattore importante nell'eziologia della SM. I nostri recenti risultati hanno dimostrato che le cellule NK di un sottogruppo di pazienti affetti da SM sono caratterizzate da una risposta peculiare all'infezione da herpesvirus umano (HHV). In particolare, questi pazienti sono caratterizzati dall'espressione dei recettori Killer Ig-like (KIR) 2DL2, che inibiscono l'attivazione delle cellule NK aumentando la suscettibilità all'HHV e la frequenza dell'attività della malattia MRI (Magnetic Resonance Imaging).

Lo scopo di questa proposta è stato indagare come tale disregolazione del sistema immunitario innato possa influenzare le risposte autoimmuni nella SM. Il primo obiettivo di questo progetto è stato confermare l'associazione tra l'espressione del recettore KIR2DL2 sulle cellule NK e l'aumento dei livelli di anticorpi anti-HHV e della carica virale, sia nel sangue periferico che nel liquido cerebrospinale. L'obiettivo finale della proposta è stato studiare l'effetto dell'immunodeficienza innata sulla risposta immunitaria e di conseguenza sulla patogenesi della SM. La delucidazione di questi meccanismi è rilevante per definire una condizione specifica per la malattia da SM.

## RISULTATI

Siamo stati in grado di completare tutti i reclutamenti e gli esperimenti come riportato nella proposta di ricerca. Avevamo bisogno di un'estensione di 6 mesi per completare tutti i reclutamenti e gli esperimenti, a causa delle difficoltà associate alla condizione di pandemia COVID19.

Abbiamo completato il Work Package (WP) 1 (Reclutamento di pazienti RR-CDMS (SM), controlli sani e OIND). Abbiamo arruolato 40 pazienti caucasici RR-CDMS (sclerosi multipla clinicamente diagnosticata recidivante-remittente) non imparentati, 40 pazienti caucasici con altre malattie neurologiche (malattie neurologiche infiammatorie e non infiammatorie) e 40 controlli sani caucasici. Campioni di CSF e plasma sono stati raccolti da 100 pazienti RR-CDMS arruolati alla diagnosi e precedentemente genotipizzati per gli alleli KIR.

Abbiamo eseguito il WP2 (Espressione KIR e titoli anticorpali anti-HHV in pazienti con SM e controlli). Abbiamo valutato i livelli di anticorpi (IgM e IgG) verso gli Herpesvirus (HHV) nei campioni di plasma di 100 pazienti affetti da SM, in fase di remissione, 40 controlli sani e 40 soggetti con altre malattie neurologiche infiammatorie (OIND). I risultati ottenuti dall'analisi di EBV EBNA1 IgG, VZV e HSV-1 hanno evidenziato che i pazienti con SM presentavano una

percentuale maggiore di soggetti positivi principalmente nel sottogruppo KIR2DL2 positivo. La percentuale di positività per HHV-6 IgG era simile tra le tre popolazioni, ma il sottogruppo positivo per MS KIR2DL2 aveva la percentuale più alta di campioni positivi. Lo stato infiammatorio dei soggetti, valutato dai livelli plasmatici di 9 citochine pro- o antinfiammatorie, ha mostrato che i pazienti con SM e OIND hanno i più alti livelli di citochine pro-infiammatorie rispetto ai soggetti di controllo.

Abbiamo eseguito la caratterizzazione delle cellule NK e T del WP3 (Caratterizzazione delle sottopopolazioni di cellule NK e T in presenza di infezioni da HHVs).

Le cellule natural killer (NK) KIR2DL2 positive e negative di MS, OIND e controlli sono state co-coltivate con cellule infette da microglia HSV-1, HHV-6A, HHV-6B, VZV ed EBV. Abbiamo mostrato un aumento delle cellule NK KIR2DL2 negative attivate da tutte e tre le popolazioni in presenza di cellule infette. Al contrario, le cellule NK positive al KIR2DL2 dei pazienti con SM non sono state attivate in presenza di cellule infette.

Abbiamo osservato che i soggetti che rispondono con un maggiore aumento dell'espressione di KIR2DL2 in presenza di un'infezione da HHV erano caratterizzati da un punteggio EDSS più elevato, a supporto di un coinvolgimento anche nello stato di malattia. Allo stesso modo, i soggetti che rispondono con un maggiore aumento dell'espressio-

ne di KIR2DL2 in presenza di un'infezione da HHV erano caratterizzati da una maggiore frequenza di attività della malattia alla risonanza magnetica.

Abbiamo osservato un aumento della stimolazione antigenica cronica delle cellule T nei soggetti KIR2DL2 positivi, che ha portato a un fenotipo simile all'esaurimento anergico, con un repertorio TCR più privato.

## CONCLUSIONI

Questi risultati suggeriscono che un controllo immunitario inefficace dell'infezione da HHVs nei pazienti con SM può essere un fattore che precede e consente la riattivazione del virus nel sistema nervoso centrale e può causare l'esacerbazione della malattia. La possibilità di fornire una caratterizzazione completa della risposta delle cellule NK in ciascun paziente con SM potrebbe aiutare ad aumentare la sicurezza della terapia con farmaci biologici e immunosoppressori (ad es. Fingolimod, Natalizumab), che potrebbero riattivare l'infezione da HHV. Inoltre, la disponibilità di Lirilumab (IPH2102/BMS-986015), un anticorpo monoclonale umano che blocca l'interazione del recettore KIR2DL2 e dei suoi ligandi, con uno studio in corso di fase II randomizzato sui tumori, potrebbe consentire un approccio terapeutico per promuovere l'attivazione delle cellule NK verso l'infezione da HHV in pazienti con SM con possibile effetto di miglioramento dell'esito della malattia.

# Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive multiple sclerosis patients: mechanisms triggering autoimmunity

## INTRODUCTION AND AIMS

Recent observations suggest that innate immunity, and in particular Natural Killer (NK) cells, might be a major factor in the etiology of MS. Our recent results have shown that NK cells from a subgroup of MS patients are characterized by a peculiar response to Human Herpesviruses (HHVs) infection. In particular, these patients are characterized by the expression of KIR (Killer Ig-like receptors) 2DL2 receptor, that inhibits NK cell activation increasing the susceptibility to HHVs and the frequency of MRI (Magnetic Resonance Imaging) disease activity.

The aim of this proposal was to study how such dysregulation of the innate immune system could impact autoimmune responses in MS. The first aim of this project was to confirm the association between the expression of KIR2DL2 receptor on NK cells and increased levels of anti-HHV antibodies and viral load, in both peripheral blood and CSF. The final objective of the proposal was to study

the effect of the innate immune impairment on immune response and consequently on MS pathogenesis. The elucidation of these mechanisms is relevant to define a condition that is peculiar only for MS disease.

## RESULTS

We have been able to complete all the recruitments and experiments as reported in the research proposal. We needed an extension of 6 months to complete all the recruitments and experiments, due to the difficulties associated with COVID19 pandemic condition.

We have completed the WP 1 (Recruitment of RR-CDMS (MS) patients, healthy controls and OIND). We have enrolled 40 unrelated Caucasian RR-CDMS (relapsing-remitting clinically diagnosed Multiple Sclerosis) patients, 40 Caucasian patients with other neurological diseases (inflammatory and non-inflammatory neurological diseases) and 40 Caucasian healthy controls. CSF and plasma

samples have been collected from 100 RR-CDMS patients enrolled at diagnosis and previously genotyped for KIR alleles.

We performed the WP2 (KIR expression and anti-HHVs antibodies titres in MS patients and controls). We have evaluated the levels of antibodies (IgM and IgG) towards Herpesviruses (HHVs) in the plasma samples of 100 MS patients, in remission phase, 40 healthy controls and 40 subjects with other inflammatory neurological diseases (OIND). The results obtained by the analysis of EBV EBNA1 IgG, VZV and HSV-1 evidenced that MS patients presented a higher percentage of positive subjects mainly in the KIR2DL2 positive subgroup. The percentage of positivity for HHV-6 IgG was similar between the three populations, but MS KIR2DL2 positive subgroup had the highest percentage of positive samples. The inflammatory state of the subjects, evaluated by plasma levels of 9 pro- or anti-inflammatory cytokines, showed that MS and OIND patients have the highest levels of pro-inflammatory cytokines in comparison with control subjects.

We performed the characterization of NK and T cells of the WP3 (Characterization of NK and T cell subpopulations in the presence of HHVs infections).

Positive and negative KIR2DL2 Natural killer (NK) cells from MS, OIND and controls were co-cultured with HSV-1, HHV-6A, HHV-6B, VZV and EBV microglial infected cells. We showed an increase in activated KIR2DL2 negative NK cells from all the three populations in the presence of infected cells. In contrast, KIR2DL2 positive NK cells from MS patients were not activated in the presence of cells infected cells.

We observed that the subjects that respond with a greater increase of KIR2DL2 expression in the presence of a HHV infection were characterized by a higher EDSS score, supporting an involvement also in disease status. Similarly, the subjects that respond with a greater increase of KIR2DL2 expression in the presence of a HHV infection were characterized by a higher frequency of MRI disease activity. We observed an increase in chronic antigenic stimulation of T cells in KIR2DL2 positive subjects that led to an anergic exhaustion-like phenotype, with a more private TCR repertoire.

## CONCLUSIONS

These results suggest that ineffective immune control of HHVs in patients with MS may be one factor preceding and enabling the reactivation of the virus in the central nervous system and may cause exacerbation of the disease. The possibility to give a complete characterization of NK cell response in each MS patient could help in increasing the safety of therapy with biological and immune-suppressive drugs (e.g. Fingolimod, Natalizumab), that could reactivate HHV infection. Moreover, the availability of Lirilumab (IPH2102/BMS-986015), a human monoclonal antibody that blocks the interaction of KIR2DL2 receptor and its ligands, with an ongoing randomized Phase II trial in tumors, could allow a therapeutic approach to promote NK cell activation towards HHV infection in MS patients with a possible rebound in disease outcome.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Bortolotti D, Gentili V, Caselli E, Sicolo M, Soffritti I, D'Accolti M, Barao I, Rotola A, Di Luca D, Rizzo R. DNA Sensors' Signaling in NK Cells During HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 Infection. *Front Microbiol.* 2020; 11:226. doi: 10.3389/fmicb.2020.00226
- Bortolotti D, Gentili V, Bortoluzzi A, Govoni M, Schiuma G, Beltrami S, Rizzo S, Baldi E, Caselli E, Pugliatti M, Castellazzi M, Fernández M, Fainardi E, Rizzo R. Herpesvirus Infections in KIR2DL2-Positive Multiple Sclerosis Patients: Mechanisms Triggering Autoimmunity. *Microorganisms.* 2022; 10(3):494. doi: 10.3390/microorganisms10030494
- Gentili V, Turrin G, Marchetti P, Rizzo S, Schiuma G, Beltrami S, Cristofori V, Illuminati D, Compagnin G, Trapella C, Rizzo R, Bortolotti D, Fantinati A. Synthesis and biological evaluation of novel rhodanine-based structures with antiviral activity towards HHV-6 virus. *Bioorg Chem* 2022;119:105518. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105518
- Amoriello R, Rizzo R, Mariottini A, Bortolotti D, Gentili V, Bonechi E, Aldinucci A, Carnasciali A, Peruzzi B, Repice AM, Massacesi L, Fainardi F, Ballerini C. Investigating Serum sHLA-G Cooperation With MRI Activity and Disease-Modifying Treatment Outcome in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2022; 13:872396. doi: 10.3389/fneur.2022.872396. eCollection 2022



- Rizzo S, Schiuma G, Beltrami S, Gentili V, Rizzo R, Bortolotti D. Role of KIR Receptor in NK Regulation during Viral Infections. *Immuno* 2021, 1(3), 305-331; <https://doi.org/10.3390/immuno1030021>.
- Pi KS, Bortolotti D, Sang Y, Schiuma G, Beltrami S, Rizzo S, Bortoluzzi A, Baldi E, Creagh AL, Haynes CA, Rizzo R, Straus SK. Studying the interactions of U24 from HHV-6 in order to further elucidate its potential role in MS. *Viruses*. 2022 Oct 28;14(11):2384. doi: 10.3390/v14112384
- Bortolotti D., Gentili V., Rotola A., Di Luca D., Rizzo R. 3-D spheroid model to improve Human herpesvirus in vitro infection models. SIV-ISV Congress, 2019
- Schiuma G., Pi K., Beltrami S., Rizzo S., Bortolotti D., Straus S.K., Rizzo R. Interaction of U24 from Human Herpes Virus 6B with Nedd4 WW and Fyn-SH3 domains: the importance of phosphorylation and potential link to MS. SIV-ISV Congress, 2022
- Beltrami S., Schiuma G., Gentili V., Rizzo S., Bortolotti D., Rizzo R. Herpesvirus infections in KIR-2DL2 positive Multiple sclerosis patients: mechanisms triggering autoimmunity. SIV-ISV Congress, 2022

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2019 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 90.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 90,000

# Meccanismi di controllo astrocitario nella neuroinfiammazione



## Cinthia Farina

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

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Emanuela Colombo, Michela Bartocchetti, Sandra Abdullatef, Claudia Bassani, Anthea De Angelis, Pasquale Conforti, Pascente Rosaria, Daniela Triolo, Paolo Siniscalchi**

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

**Gianvito Martino**, *Università Vita-Salute San Raffaele, e Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Carla Taveggia**, *Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Angelo Quattrini**, *Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Vittorio Martinelli**, *Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Giancarlo Comi**, *Università Vita-Salute San Raffaele, e Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Massimo Filippi**, *Università Vita-Salute San Raffaele, e Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe e Divisione di Neuroscienze, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

**Jia Newcombe, NeuroResource**, *Department of Neuroinflammation, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Gli astrociti sono la popolazione gliale più abbondante nel sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi e hanno la capacità di comunicare con le cellule immunitarie, neuronali e gliali. In seguito a danno nel sistema nervoso centrale (SNC) gli astrociti esercitano un ruolo ambivalente, poiché da un lato partecipano alla formazione della cicatrice, alla demielinizzazione e ai processi infiammatori che possono determinare neurotossicità e demielinizzazione, dall'altra hanno la potenzialità di spegnere l'infiammazione e promuovere meccanismi di riparo tissutale endogeni. Scopo di questo progetto era di determinare come gli astrociti regolassero alcuni eventi patogenetici della sclerosi multipla (SM), quali la neurodegenerazione e la demielinizzazione del SNC, mediante una serie di studi in vitro, in vivo ed ex vivo.

## RISULTATI

A seguito della riduzione di budget ed in considerazione

dei suggerimenti del Comitato Scientifico FISM, abbiamo ridimensionato alcuni obiettivi ed esperimenti proposti nel progetto originale. Nonostante ciò, abbiamo generato nuove rilevanti informazioni sul contributo degli astrociti alla neuroinfiammazione, di gran lunga oltre lo scopo ed il programma sperimentale originali.

I risultati più importanti, pubblicati recentemente sulla prestigiosa rivista P.N.A.S., sono derivati dagli studi sull'interazione tra astrociti ed oligodendrociti e dalla validazione su tessuti cerebrali umani. Abbiamo infatti descritto un nuovo meccanismo di demielinizzazione provocato dalla redistribuzione del rame ad opera degli astrociti nelle lesioni della sostanza bianca delle persone con sclerosi multipla e dei suoi modelli murini sperimentali. Il rame è un metallo essenziale per la fisiologia del SNC e sia la sua mancanza che il suo accumulo sono nocivi per il tessuto nervoso. Viene assunto con la dieta, assorbito nel tratto gastro-intestinale, trasportato al fegato e quindi rilasciato nel flusso sanguigno. Il rame può entrare nel SNC tramite

specifici trasportatori presenti sulla membrana delle cellule endoteliali. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che, mentre i livelli di rame circolanti nel sangue sono maggiori nelle donne rispetto agli uomini nella popolazione sana e non alterati nella SM, le lesioni della sostanza bianca nella SM e nei modelli animali sono caratterizzate da una elevata espressione di trasportatori del rame, soprattutto negli astrociti. Studi in vitro hanno messo in luce come gli astrociti riescano a prendere e poi rilasciare rame a livelli che possono indurre perdita di mielina e morte degli oligodendrociti. Questo meccanismo dipende dal recettore TrkB delle neurotrofine, che regola i flussi di calcio e i trasportatori del rame astrocitari in risposta a stimoli infiammatori e tossici. Infatti, l'eliminazione di TrkB sugli astrociti riduce l'espressione dei trasportatori del rame in vitro e in vivo durante la neuroinfiammazione, e protegge dalla demielinizzazione nei modelli animali di malattia.

Un altro obiettivo del nostro progetto FISM era di sviluppare modelli in vitro di astrociti umani. A tal fine abbiamo generato linee di astrociti derivati dalla riprogrammazione di fibroblasti isolati da cute umana, le abbiamo caratterizzate nel loro fenotipo e nella loro funzione ed usate per acquisire nuove informazioni sull'azione di farmaci approvati o sperimentali per la SM (siponimod, fingolimod e laquinimod) sull'attività dell'astrocita e sull'interazione astrocita-neurone. Questi studi hanno condotto a due pubblicazioni e ad una revisione della letteratura su una rivista ad alto impatto.

Infine, abbiamo investigato l'efficacia del trapianto di astrociti nella SM sperimentale e dimostrato che sia gli astrociti primari isolati dal cervello murino che gli astrociti murini generati da fibroblasti riprogrammati possono migliorare l'espressione della malattia nel topo. Studi istologici hanno indicato un effetto a lungo termine del trapianto di astrociti sulle cellule gliali del SNC associato ad un maggior contenuto di mielina.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti con questo progetto hanno messo in evidenza un nuovo processo patogenetico nella SM responsabile della demielinizzazione e dovuto ad alterazioni nel trasporto del rame nel tessuto neurale. Il traffico dei metalli può essere visualizzato in vivo mediante tecniche non invasive di analisi delle immagini. Possiamo quindi ipotizzare che l'applicazione di queste tecniche ai pazienti con sclerosi multipla possa aiutare a monitorare il trasporto locale del metallo e l'evoluzione delle lesioni nel tempo e possa servire a determinare l'impatto delle terapie su un preciso processo di demielinizzazione.

Inoltre, la conoscenza prodotta sul funzionamento di questo processo può essere utilizzata per lo sviluppo di nuovi bersagli terapeutici.

Infine, la generazione ed utilizzo di cellule astrocitarie umane è servita a gettare nuova luce sull'impatto di farmaci sperimentali o approvati per la SM sull'attività degli astrociti e sulla neurodegenerazione.

# Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation

## INTRODUCTION AND AIMS

Astrocytes are the most abundant glia cell type in the mammalian central nervous system (CNS) and communicate with immune, neural and other glia cells. In injured CNS astrocytes may exert a dual role, as on the one hand they participate to scar formation, demyelination and inflammatory processes which may drive neural toxicity and myelin loss; on the other hand they may switch off inflammation and support endogenous tissue repair. Goal of this project was to assess how astrocytes may rule pathogenic events occurring in Multiple Sclerosis (MS), including CNS neurodegeneration and demyelination, using a series of in vitro, in vivo and ex vivo experiments.

## RESULTS

Following budget reduction and suggestions by FISM Scientific Committee, we reduced some of the aims and omics studies proposed in the original project. Still, we provided seminal information about astrocyte contribution to neuroinflammation, well beyond the original scope and experimental program.

The most relevant findings, recently published in a

P.N.A.S. article, were derived from the studies about astrocyte-oligodendrocyte crosstalk and the validation on human MS tissue. We have in fact described a novel demyelination mechanism resulting from astrocyte-dependent copper redistribution in the white matter of MS patients and experimental models of MS. Copper is an essential metal for CNS physiology and either its deficiency or accumulation are detrimental for the nervous tissue. It is absorbed in the gut from the diet, transported to the liver and released into the bloodstream. It can enter the CNS through specific membrane transporters expressed by endothelial cells. We have shown that, while circulating copper levels are sexually dimorphic but not altered in MS, white matter lesions in multiple sclerosis and its animal models are characterized by enhanced expression of copper transporters, mainly on astrocytes. In vitro studies have highlighted that astrocytes can take up and release copper at levels that can induce myelin loss and oligodendrocyte death. This mechanism depends on the activation of the neurotrophin receptor TrkB, which works as key regulator of glial calcium flux and of copper transporters in response to inflammatory and toxic signals. In fact, TrkB deficiency in astrocytes impairs

expression of copper transporters in vitro and in vivo during neuroinflammation and mediates protection from demyelination in EAE and cuprizone models.

Another goal of our FISM project was to develop in vitro models for human astrocytes. For this purpose we generated several lines of fibroblast-derived astrocytes, which were characterized in their phenotype and function, and used to gain additional information about the action of approved and experimental drugs (siponimod, fingolimod and laquinimod) on astrocyte and astrocyte-neuron crosstalk. These studies are illustrated in two publications and one high impact review.

Finally, we investigated the efficacy of astrocyte transplantation in experimental MS and demonstrated that both primary astrocytes and astrocytes derived from reprogrammed mouse fibroblasts can ameliorate EAE expression. Histological studies indicate a long-standing effect of astrocyte transplantation on resident glia cells associated with enhanced myelin content.

## CONCLUSIONS

Results obtained with this project have highlighted a new pathogenic process in MS triggering demyelination and due to alterations of copper transport in neural tissue. Metal ion trafficking can be assessed in vivo by modern non-invasive imaging techniques. We envisage that application of such techniques in MS can help to monitor local transport of the metal and lesion evolution in time and assess the impact of CNS-directed therapies specifically on this demyelinating process.

Further, the knowledge produced about process functioning may be used for the development of novel therapeutic targets.

Finally, the generation and usage of human astrocytes has unravelled the impact of experimental or approved drugs for MS on astrocyte function and neurodegeneration.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/ Publications

- Colombo E and Farina C. Lessons from S1P receptor targeting in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 2022 Feb;230:107971
- Olude MA, Mouihate A, Mustapha OA, Farina C, Quintana FJ and Olopade JO. Astrocytes and microglia in stress-induced neuroinflammation: the African perspective. *Front Immunol.* 2022 May 30;13:795089
- Cossu D, Watson RO, Farina C. A Microbial View of Central Nervous System Disorders: Interplay Between Microorganisms, Neuroinflammation and Behaviour. *Front Immunol.* 2021 Dec 16;12:816227.
- Colombo E, Triolo D, Bassani C, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Fredrickx E, Fermo I, Martinelli V, Newcombe J, Taveggia C, Quattrini A, Comi G and Farina C. Dysregulated copper transport in multiple sclerosis may cause demyelination via astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jul 6;118(27):e2025804118..
- Grassivaro F, Martino G, Farina C. The phenotypic convergence between microglia and peripheral macrophages during development and neuroinflammation paves the way for new therapeutic perspectives *Neural Regen Res.* 2021 Apr;16(4):635-637
- Colombo E, Pascente R, Triolo D, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, Ottoboni L, Comi G, Martino G and Farina C. Laquinimod modulates human Astrocyte Function and dampens Astrocyte-Induced Neurotoxicity during inflammation. *Molecules.* 2020 Nov 18;25(22):5403
- Colombo E, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, Ottoboni L, Comi G, Martino G and Farina C. Siponimod (BAF312) Activates Nrf2 While Hampering NF- $\kappa$ B in Human Astrocytes, and Protects From Astrocyte-Induced Neurodegeneration. *Front Immunol.* 2020 Apr 8;11:635

### Comunicazioni a Congressi/ Congress Presentations

- Colombo E, Bartocchetti M, Pascente R, Triolo D, Bassani C and Farina C. Astrocyte TrkB signalling is a key target of S1P receptor modulators during neuroinflammation. *More than neurons 3rd edition, Torino (Italy), 15-17 December 2022*
- Abdullatef S, Bartocchetti M, Colombo E, Acquaviva M, Bassani C, De Angelis A, Conforti P, Ruffini F, Ottoboni L., Panina P, Martino G., Farina C. Astrocytes as Therapeutic Tool in Multiple Sclerosis. *More than neurons 3rd edition, Torino (Italy), 15-17 December 2022*



- Farina C. Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation. FISM Annual Scientific Congress Rome (Italy), 24-26 May 2022
- Colombo E, Bartocchetti M, Pascente R, Triolo D, Bassani C and Farina C. S1P receptor modulators may interfere with astrocyte TrkB signalling during neuroinflammation. XXX AINI Congress, Riccione (Italy), 16-19 May 2022
- Abdullatef S, Bartocchetti M, Colombo E, Acquaviva M, Bassani C, De Angelis A, Conforti P, Ruffini F, Ottoboni L., Panina P, Martino G. and Farina C. Astrocytes as Therapeutic Tool in Multiple Sclerosis. XXX AINI Congress, Riccione (Italy), 16-19 May 2022
- Colombo E, Triolo D, Bassani C, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Fredrickx E, Fermo I, Martinelli V, Newcombe J, Taveggia C, Quattrini A, Comi G and Farina C. Astrocyte TrkB may regulate copper transport and foster demyelination. European Charcot Foundation 29th Annual Meeting, Baveno, Italy (Virtual Event) 14 - 18 November 2021
- Colombo E, Triolo D, Bassani C, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Fredrickx E, Fermo I, Martinelli V, Newcombe J, Taveggia C, Quattrini A, Comi G and Farina C. Astrocyte TrkB may regulate copper transport and foster demyelination in multiple sclerosis. 15th ISNI congress, Nice, France (Virtual Event), 8-12 November 2021
- Farina C. Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation. FISM Annual Scientific Congress, Rome (Italy), 26-28 October 2021
- Colombo E, Triolo D, Bassani C, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Fredrickx E, Fermo I, Martinelli V, Newcombe J, Taveggia C, Quattrini A, Comi G and Farina C. TrkB signalling in astrocytes may promote demyelination by altering copper transport. XXIX AINI Congress, Verona, 16-19 September 2021
- Farina C. Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation. FISM Annual Scientific Congress, Virtual Event, 26-27 November 2020
- Colombo E, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, Ottoboni L, Comi G, Martino G and Farina C. Human fibroblast-derived astrocytes as cell model system for studying neuroprotective compounds targeting glia-neuron interaction: the Siponimod case study. RIN (Rete IRCCS delle neuroscienze e della neuroriabilitazione) 1st Annual meeting, Virtual event, 8-9 July 2020
- Farina C. Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation. Italian MS Society Foundation 2019 Annual Scientific Congress, Rome, 29-31 May 2019
- Colombo C, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, Ottoboni L, Martino G and Farina C. Siponimod supports physiological and anti-oxidant action of human astrocytes and protects from astrocyte-induced neurodegeneration. XXVIII AINI Congress, Camogli (Genova, Italy), 6-9 May 2019
- Colombo E, Triolo D, Bacigaluppi M, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Cerri F, Fredrickx E, Descamps H, Bergamaschi A, Landsberger N, Newcombe J, Taveggia C, Martino G, Quattrini A and Farina C. Activation of the neurotrophin receptor TrkB in astrocytes supports acute and chronic CNS injury. 14th ISNI Congress, Brisbane (Australia), 27-31 August 2018.
- Colombo E, Triolo D, Bacigaluppi M, Bedogni F, Di Dario M, Dina G, Cerri F, Fredrickx E, Descamps H, Bergamaschi A, Landsberger N, Newcombe J, Taveggia C, Martino G, Quattrini A and Farina C. TrkB in astrocytes supports acute and chronic CNS injury. XXVII AINI Congress, Trieste (Italy), 7-10 May 2018
- Colombo E, De Angelis A, Triolo D, Merlini A, De Feo D, Laterza C, Brambilla E, Martino G and Farina C. Towards personalized astrocyte transplantation as cell-therapy for experimental multiple sclerosis. Nature Conference, Regeneration, Milan (Italy), 16-18 November 2017

#### Presentazioni su invito/Invited Lectures

- Farina C. 23th Annual Meeting Swiss Society for Neuroscience, Fribourg, June 2022.
- Farina C. La Medicina di Genere in Neurologia, Istituto Neurologico Carlo Besta, digital meeting, Oct 2021.
- Farina C. XXIX AINI Congress, Verona Sept 2021
- Farina C. International Women in MS, digital meeting, March 2021
- Farina C. European Charcot Foundation, 28th Annual Meeting, digital meeting, Nov 2020.
- Farina C. International Women in MS, digital meeting, March 2020
- Farina C. IXL Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Firenze Nov 2019.
- Farina C. Cell Symposium, Neuroimmune axis, Long Beach USA, Sept 2019
- Farina C. II Edition, More than Neurons Congress, Torino Nov 2018
- Farina C. Global School of Neuroimmunology, Brisbane Australia Aug 2018

#### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di tre anni (prorogato di 24 mesi) e l'ammontare di 226.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of three years (extended by 24 months) and the amount of € 226,000

# Induzione di fagociti antiinfiammatori e risoluzione dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale: ruolo di IGF-1



## Giuseppe Locatelli

*Vecchio indirizzo/Old address: Theodor Kocher Institute, Universität Bern, Bern, Switzerland*

*Nuovo indirizzo/New address: Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland*

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Dr. Daniela Ivan, Kristina Berve, Jasmin Steudler**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS

**Marco Prinz, Katharina Borst, Uniklinik Freiburg, Germany**

**Thorsten Buch, Filipa Ferreira, University Zurich, Switzerland**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Si ipotizza che lo sviluppo della sclerosi multipla (SM) e del suo modello animale ESA siano imputabili all'azione infiammatoria di cellule fagocitarie infiltranti il sistema nervoso centrale (SNC). Tali cellule agiscono come fattori pro-infiammatori prima di tramutarsi in agenti anti-infiammatori. Contemporaneamente, altre popolazioni fagocitiche risiedono all'interno del SNC e nelle sue barriere emato-encefaliche condizionando l'evoluzione della patologia. Lo scopo del nostro lavoro è di diminuire l'infiammazione nel SNC descrivendo attivazione e accumulazione di fagociti nelle barriere emato-encefaliche e concentrandosi su un sistema biologico implicato nella regolazione del fenotipo cellulare dei fagociti, ovvero IGF-1.

## RISULTATI

Abbiamo dimostrato che fagociti pro- e anti-infiammatori si accumulano in diversa proporzione all'altezza di distinte barriere emato-encefaliche; inoltre, le cellule costituenti tali barriere controllano direttamente il tipo di attivazione infiammatoria dei fagociti infiltranti durante ESA.

Secondariamente, investigando il ruolo di IGF-1 nella funzionalità dei fagociti alle barriere emato-encefaliche, abbiamo dimostrato che l'assenza di IGF-1R comporta significativi cambiamenti nella morfologia di queste cellule, ed una forte diminuzione dell'intensità della malattia in modelli murini di SM.

## CONCLUSIONI

Il nostro lavoro dimostra che l'interazione tra barriere emato-encefaliche e cellule fagocitiche controlla l'attivazione infiammatoria di queste ultime, pertanto condizionando a sua volta l'evoluzione dell'infiammazione nel SNC. Al contempo, abbiamo dimostrato che l'attivazione del recettore per IGF-1 in fagociti residenti nel SNC svolge una funzione anti-infiammatoria.

In sintesi, il nostro studio sottolinea l'importanza patologica dei fagociti alle barriere emato-encefaliche durante SM, e dimostra che IGF-1 potrebbe essere rivalutato come fattore terapeutico per diminuire l'infiammazione tissutale nei pazienti con SM.

# How to drive anti-inflammatory macrophage activation to ameliorate neuroinflammation: role of insulin-like growth factor 1

## INTRODUCTION AND AIMS

Phagocytes guide multiple sclerosis (MS) and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) development by phagocytes invading the central nervous system (CNS) as pro-inflammatory cells and slowly evolving their phenotype into anti-inflammatory cells. In parallel, phagocytic populations already reside within the CNS and its borders, guiding disease evolution in unknown ways.

Our aims are to ameliorate CNS inflammation by describing the activation and accumulation of different macrophages at brain barriers and by focusing on a candidate pathway regulating cell phenotype, i.e. the Insulin-like Growth factor 1 (IGF-1).

## RESULTS

We showed that pro- and anti-inflammatory phagocytes differentially accumulate at distinct CNS barriers, and observed that endothelial and epithelial CNS barrier cells significantly affect the activation state and functions of CNS-invading macrophages during autoimmune inflammation.

Secondly, we investigated the role of IGF-1R in CNS resident microglia/macrophages. Receptor deletion significantly altered the morphology of microglia and of leptomeningeal macrophages. Induction of EAE resulted into a significantly worsened disease course in KO animals, indicating that IGF1R function in CNS resident macrophages is protective and its de-regulation leads to increase inflammatory responses in the CNS.

## CONCLUSIONS

Our data indicate that interaction between invading cells and CNS barrier cells significantly shape the function of invading cell and thus affect the pathological and clinical evolution of autoimmune CNS inflammation.

At the same time, our work indicates that IGF-1R stimulation in these cells plays an anti-inflammatory function similar to the one described in peripheral macrophages. Together, our study highlight the importance of targeting macrophage actions at CNS borders in MS patients, while supporting the further testing of IGF-1 as a therapeutic candidate for the treatment of CNS inflammatory conditions.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations

- *Presentazione/Talk - Virtual Symposium "Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers", September 2021*
- *Poster - Cold Spring Harbor Laboratory Brain barriers meeting, April 2021*
- *Presentazione/Talk-"Freiburg Neuroimmunology Vis a Vis", September 2022*
- *Presentazione/Talk-"SYIS Annual Symposium", May 2022*
- *Presentazione/Talk-"AINI conference 2021", September 2021*



#### Pubblicazioni/Publications

- Ivan DC, Walthert S, Locatelli G. Central nervous system barriers impact distribution and expression of iNOS and arginase-1 in infiltrating macrophages during neuroinflammation; *Front Immunol.* 2021 Apr 15;12:666961. doi: 10.3389/fimmu.2021.666961. eCollection 2021 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.666961/full>
- Ivan D, Walthert S, Berve K, Steudler J, Locatelli G. Dwellers and trespassers: mononuclear phagocytes at the borders of the central nervous system. *Front Immunol.* 2021 Mar 5;11:609921. doi: 10.3389/fimmu.2020.609921. eCollection 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.609921/full>
- Ivan DC, Berve KC, Walthert S, Monaco G, Borst K, Bouillet E, Ferreira F, Lee H, Steudler J, Buch T, Prinz M, Engelhardt B, Locatelli G. Insulin-like growth factor-1 receptor controls the function of CNS-resident macrophages and their contribution to neuroinflammation. *Acta Neuropathol Commun.* 2023 Mar 8;11(1):35. doi: 10.1186/s40478-023-01535-8. PMID: 36890580; PMCID: PMC9993619

#### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 60.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years and the amount of € 60,000

# Ricerca di effettori decisivi delle alterazioni del reguloma nella SM: disregolazione LMP1-mediata di AID nella patogenesi della SM



## Rachele Bigi

Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso (NESMOS),  
Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

COLLABORATORI/COLLABORATORS  
**Marco Salvetti, Giovanni Ristori**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Mentre la comprensione della fisiopatologia della sclerosi multipla (SM) aumenta, la definizione dell'eziologia della malattia rimane un'esigenza non soddisfatta. Come per la maggior parte delle malattie multifattoriali, le alterazioni elusive del reguloma sono parte del problema. Nel corso degli anni abbiamo cercato di combinare informazioni genetiche, epidemiologiche e immunologiche per capire come questo quadro complesso si incanali in un meccanismo fisiopatologico specifico e terapeuticamente perseguibile nella SM. I nostri dati e quelli di altri gruppi di ricerca suggeriscono che una parte significativa di questa complessa disregolazione converge sulla via del CD40, un regolatore principale delle risposte dei linfociti B. Tuttavia, le principali implicazioni meccanicistiche della disregolazione del CD40 rimangono poco chiare.

Lo scopo di questo progetto era di indagare se la disregolazione del CD40 possa essere meglio compresa tenendo conto dei possibili effettori di un altro regolatore principale del pathway (che è implicato nell'eziologia della SM), ovvero il virus di Epstein-Barr (EBV). In particolare, la nostra ricerca si è concentrata sulla comprensione di se e come la proteina latente di membrana 1 (LMP1), una proteina di latenza di EBV e mimico del CD40, concorra con il CD40 nella regolazione dell'attività della deaminasi indotta dall'attivazione (AID), uno dei principali fattori di variabilità dell'espressione genica acquisita e un regolatore principale della risposta delle cellule B, noto per essere sotto il controllo della via del CD40.

### RISULTATI

Il nostro primo passo è stato quello di verificare l'espressione di AID in diverse linee di cellule B, EBV positive e negative, mediante tecniche di western blot e qPCR.

In entrambi i casi, abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione di AID nelle cellule EBV positive, soprattutto in quelle LMP1+. Il passo successivo è stato quello di silenziare LMP1 con il sistema CRISPR/Cas9, per evidenziare il coinvolgimento di LMP1 nella regolazione di AID, in linee cellulari linfoblastoidi (LCL) stabilite da infezione con B95.8 (un ceppo di laboratorio di EBV) o da infezione spontanea provenienti da pazienti con relapsing-remitting SM e da donatori sani, un modello in vitro che ci ha aiutato a correlare la nostra ipotesi originale alla SM. Gli esperimenti di trasduzione hanno richiesto diversi mesi per essere perfettamente impostati, abbiamo dovuto provare diversi MOI di lentivirus, poiché le cellule B (le LCL in particolare) sono molto delicate e la mortalità era inizialmente troppo alta. Alla fine abbiamo trovato la condizione giusta ed è stato possibile eseguire le qPCR per AID su queste linee cellulari CRISPRate. Abbiamo riscontrato una diminuzione dell'espressione del gene AID nelle LCL LMP1-CRISPRate rispetto alle linee cellulari parentali e al controllo negativo; in particolare, nelle LCL ottenute da donatori sani, la diminuzione dell'espressione di AID è minore rispetto ai pazienti con SM. Questi dati suggeriscono che il pathway CD40-LMP1-AID potrebbe essere diverso tra pazienti e controlli. Per essere certi che questi cambiamenti nell'espressione di AID dipendessero effettivamente dal silenziamento di LMP1, abbiamo reintrodotto, tramite un plasmide di espressione, la proteina silenziata e abbiamo riscontrato una ripresa dell'espressione di AID.

### CONCLUSIONI

I risultati ottenuti fino ad ora rafforzano la nostra ipotesi iniziale, cioè che il meccanismo che siamo andati ad indagare, e che è guidato dalla presenza di EBV, amplifica e

sostiene la disfunzione del reguloma nella risposta delle cellule B, così rilevante per la SM. Visti questi risultati, abbiamo in programma di espandere il nostro lavoro indagando anche sulla reintroduzione di forme mutate di LMP1, al fine di comprendere quale sia il dominio della proteina che guida questo pathway. Inoltre, vogliamo anche verificare, tramite un sequenziamento di DNA sulle regioni codificanti V(D)J delle immunoglobuline, l'attività enzimatica di AID in presenza o assenza di LMP1. La nostra indagine supporterà approcci terapeutici volti ad antagonizzare i loop patogeni che hanno origine e fan-

no parte delle cause della malattia. Si spera che tali terapie rappresentino un ulteriore passo avanti verso l'obiettivo di una cura che ponga fine alla SM, anziché limitarsi a controllarla nelle persone che ne sono affette. Inoltre, i nostri risultati possono aggiungere informazioni inedite sugli effetti di terapie che stanno entrando in una fase avanzata di valutazione clinica (e che quindi coinvolgono un numero consistente di persone con SM) e che possono comportare un certo rischio di effetti paradossali in caso di comprensione incompleta della via su cui agiscono.

## Looking for final effectors of regulome alteration in MS: LMP1-mediated dysregulation of AID in MS pathogenesis

### INTRODUCTION AND AIMS

While our understanding of multiple sclerosis (MS) pathophysiology increases, the definition of the etiology of the disease remains an unmet need. As most multifactorial diseases, elusive regulome alterations are part of the problem. Over the years we have tried to combine genetic, epidemiological and immunological information to understand how this complex picture is funneled into specific (therapeutically actionable) pathophysiological mechanism in MS. Our data and those from other research groups, suggest that a significant part of this complex dysregulation converges on the CD40 pathway, a master regulator of B lymphocyte responses. However, key mechanistic implications of the CD40 dysregulation remain unclear.

The aim of this project was to investigate whether the CD40 dysregulation may be better understood taking into account possible effectors of another master regulator of the pathway (which is implicated in MS etiology), namely Epstein-Barr virus (EBV). In particular, our research was focused on the understanding whether and how latent membrane protein-1 (LMP1), an EBV protein and CD40 mimic, concurs with CD40 in regulating the activity of activation-induced deaminase (AID), a major driver of acquired gene expression variability, and a master regulator of the B cell response, known to be under the control of the CD40 pathway.

### RESULTS

Our first step was to check the AID expression in several B-cell lines, EBV positive and negative, by western blot and qPCR techniques. In both case, we found an increased AID expression in the EBV positive cells, especially in the LMP1+. Next step was to silencing LMP1 by CRISPR/Cas9 system, to highlight the involvement of LMP1 in AID regulation, in established B95.8 (a laboratory strain of

EBV) or spontaneously outgrowing lymphoblastoid cell lines (LCL) from patients with relapsing-remitting MS and from healthy donors, an in vitro model helping us to correlate our original hypothesis to MS. The transduction experiments requested several months to be perfectly set-up, we had to try different MOI of lentiviral, since B cells (LCL in particular) are very delicate and the mortality was initially too high. At the end we found the right condition and we could performed a real-time PCR for AID on these CRISPRed cell lines. We found a decrease of AID gene expression in LMP1-CRISPRed LCL in comparison with parental and with mock cell lines; more impressive, in the LCL established from healthy donors, the decrease of AID expression is less than in MS patients. This data suggests that the CD40-LMP1-AID pathway might actually be different between patients and controls. To be sure that these changes in AID expression actually depended on LMP1 silencing, we reintroduced, via an expression plasmid, the silenced protein and we found a recovery in the expression of AID.

### CONCLUSIONS

The results obtained so far reinforce our initial hypothesis, i.e. that the mechanism we went to investigate, and which is driven by the presence of EBV, amplifies and sustains the regulome dysfunction in the B-cell response that is so relevant to MS. Given these results, we plan to expand our work by also investigating the reintroduction of mutated forms of LMP1 in order to understand what protein domain drives this pathway. In addition, we also want to verify, by DNA sequencing on the V(D)J coding regions of immunoglobulins, the enzymatic activity of AID in the presence or absence of LMP1. Our investigation will support therapeutic approaches aimed at antagonizing the pathogenic loops that originate and are part of the causes of the

disease. It is hoped that such therapies will represent a further step toward the goal of a cure that ends MS, rather than merely controlling it in people with MS. In addition, our results may add novel information about the effects of therapies that are entering an advanced stage of clinical

evaluation (and thus involving substantial numbers of people with MS) and that may carry some risk of paradoxical effects if the pathway on which they act is incompletely understood.



---

# **Diagnosi e monitoraggio della malattia**

Diagnosis and monitoring  
of the disease

---

# Trasferimento interemisferico di informazioni nella sclerosi multipla: un approccio multimodale di co-registrazione TMS-EEG, MRI e coordinazione bimanuale



## Laura Bonzano

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

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Marco Bove, Ludovico Pedullà**

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

**Marta Bortoletto, Carlo Miniussi, Claudia Fracassi, Agnese Zazio, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia, Italia**

**Flavia Mattioli, Ruggero Capra, Roberto Gasparotti, ASST Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La demielinizzazione che si verifica nella sclerosi multipla (SM) causa deficit nelle proprietà conduttive degli assoni. Il Corpo Calloso (CC) è comunemente colpito nella SM e lo studio del trasferimento di informazioni interemisferico attraverso le fibre callosali è di grande interesse per la ricerca sulla SM.

L'Imaging con Tensore di Diffusione (DTI) ha dimostrato una ridotta integrità strutturale nel CC, in relazione a deficit cognitivi e sensorimotori sulla base della regione coinvolta. Tuttavia, la risonanza magnetica non spiega completamente il declino cognitivo e motorio nella SM.

La co-registrazione della stimolazione magnetica transcranica e dell'elettroencefalografia (TMS-EEG) è una tecnica all'avanguardia che può tracciare connessioni interemisferiche con alta risoluzione temporale, potenzialmente rivelando l'alterazione della propagazione interemisferica del segnale in fasi precoci.

Con un approccio multimodale basato su DTI e TMS-EEG abbiamo studiato le alterazioni anatomo-fisiologiche del CC nella SM e la loro associazione con alterazioni funzionali in un compito che richiede il trasferimento di informazioni interemisferico.

L'obiettivo era valutare, in persone con SM (PwMS), le alterazioni dell'integrità della sostanza bianca nel CC e dei proxy fisiologici della connettività transcallosale: periodo

silente ipsilaterale (iSP) e una componente precoce dei potenziali evocati dalla TMS (TEP) stimolando la corteccia motoria primaria sinistra e destra (M1) - M1-P15.

Inoltre, volevamo espandere lo sviluppo di biomarcatori neurofisiologici di comunicazione transcallosale oltre il sistema motorio, in reti corticali di funzioni cognitive superiori. Abbiamo misurato i TEP stimolando la corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC) sinistra e destra e studiato la relazione tra una componente precoce presumibilmente associata a connettività interemisferica - DLPFC-P15 con misure di integrità microstrutturale e performance cognitiva.

## RISULTATI

La TMS su M1 ha generato in PwMS una risposta TEP paragonabile ai controlli sani (HC): a brevi latenze è stato rilevato un picco positivo sui siti frontocentrali controllaterali simile a M1-P15 precedentemente trovato in HC (Bortoletto et al., 2021; FISM 2016/R/2).

L'integrità del CC era ridotta in PwMS rispetto a HC, come indicato da alterazioni di diffusività media (MD), diffusività radiale (RD) e anisotropia frazionaria (FA). In particolare, le differenze tra i gruppi erano più forti nel CC anteriore.

L'insorgenza di iSP era significativamente ritardata in PwMS.

La latenza di M1-P15 in PwMS era correlata all'integrità microstrutturale del corpo del CC, che connette le corteccie motorie: maggiore RD nel corpo del CC, maggiore la latenza; al contrario, maggiore la FA nel corpo del CC, minore la latenza.

Come in HC, più forte era la componente M1-P15 originata dalla corteccia, più forte era l'inibizione interemisferica misurata a livello periferico, supportando l'origine interemisferica di M1-P15.

La coordinazione bimanuale durante movimenti di opposizione delle dita era positivamente correlata al rapporto di latenza di M1-P15 sinistra/destra: minore latenza dell'inibizione transcallosale da M1 dominante a non dominante era associata a più fine coordinazione bimanuale.

La stimolazione della DLPFC ha generato una risposta negativa - DLPFC-P15 agli elettrodi vicino al coil della TMS e una positiva nell'emisfero controlaterale in elettrodi più posteriori. DLPFC-P15 è stata associata a prestazioni cognitive in PwMS. In particolare, la latenza di DLPFC-P15 dopo stimolazione a sinistra correlava negativamente con l'apprendimento verbale e la memoria nel Selective Reminding Test: minore latenza, migliori prestazioni nel Long Term Storage e nel Consistent Long Term Retrieval. L'am-

piezza di DLPFC-P15 era associata al Symbol Digit Modalities Test (SDMT), che valuta la velocità di elaborazione cognitiva: maggiore DLPFC-P15, minore performance al SDMT. Infine, la Word List Generation, attività di fluidità verbale semantica, era positivamente associata all'ampiezza di DLPFC-P15 dall'emisfero destro.

## CONCLUSIONI

Questo innovativo approccio multimodale è stato applicato in PwMS per consentire una valutazione diretta della funzionalità del CC e della sua relazione con il danno microstrutturale e gli esiti comportamentali. Questo progetto potrebbe avere un impatto diretto sulla ricerca clinica nella SM fornendo uno strumento per monitorare gli effetti di un trattamento, con potenziale trasferimento nella pratica clinica.

La migliore comprensione della funzionalità del CC e della "patologia" è necessaria per migliorare la gestione della SM. Infatti, lo studio della velocità di trasferimento di informazioni attraverso le fibre callosali è di grande interesse. La nostra metodologia può far luce sulle conseguenze della degradazione della mielina e dei substrati neuro-anatomici delle disabilità cognitive e sensorimotorie nella SM.

# Interhemispheric information transfer in multiple sclerosis: a multimodal approach of TMS-EEG co-registration, MRI and bimanual coordination

## INTRODUCTION AND AIMS

Demyelination occurring in Multiple Sclerosis (MS) causes deficits in the conducting properties of axons. The Corpus Callosum (CC) is commonly affected in MS; thus, the study of interhemispheric information transfer through callosal fibers is of great interest in MS research.

Diffusion Tensor Imaging (DTI) has demonstrated reduced structural integrity in the CC, in relation to cognitive and sensorimotor deficits on the basis of the CC region involved. However, magnetic resonance imaging does not completely explain cognitive and motor decline in MS.

The co-registration of Transcranial Magnetic Stimulation and Electroencephalography (TMS-EEG) is a cutting-edge technique that can trace interhemispheric connections with high temporal resolution, potentially uncovering altered interhemispheric signal propagation at early disease stages.

With a multimodal approach based on DTI and TMS-EEG we investigated the anatomo-physiological alterations of

the CC in MS and their association with functional impairments in a task requiring interhemispheric information transfer. Main aim was to assess in people with MS (PwMS) alterations of CC white matter integrity and physiological proxies of transcallosal connectivity: ipsilateral silent period (iSP) and an early component of TMS-evoked potentials (TEPs) with TMS targeting the left and right primary motor cortex (M1) - M1-P15.

Furthermore, we aimed at expanding the development of neurophysiological biomarkers of transcallosal communication beyond the motor system, in cortical networks of higher cognitive functions. We measured TEPs after stimulating the left and right dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and investigated the relationship of an early component - DLPFC-P15 with measures of CC microstructural integrity and cognitive performance.

## RESULTS

TMS over M1 generated in PwMS a TEP response comparable to healthy controls (HC): at early latencies, a positive component peaking over contralateral frontocentral sites was detected similarly to the M1-P15 previously found in HC (Bortoletto et al., 2021 - FISM 2016/R/2).

CC white matter integrity was reduced in PwMS with respect to HC, as indicated by altered mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD) and fractional anisotropy (FA). Particularly, the differences between groups were stronger in the anterior part of the CC.

The onset of iSP was significantly delayed in PwMS compared to HC. Interestingly, M1-P15 latency in PwMS was related to the microstructural integrity of the CC body, which connects motor cortices: the higher the RD in the CC body, the longer the latency of M1-P15; conversely, the higher the FA in the CC body, the shorter the latency of M1-P15.

As in HC, we found that the stronger the M1-P15 component originated from the cortex, the stronger the inter-hemispheric inhibition measured at peripheral level, supporting the interhemispheric origin of M1-P15.

Bimanual coordination during finger opposition movements was positively related to the ratio of left/right M1-P15 latency: shorter latency of transcallosal inhibition from the dominant to the nondominant M1 was associated with finer bimanual coordination.

The stimulation of the DLPFC generated a negative response - DLPFC-P15 at the electrodes close to the TMS coil and a positive response in the contralateral hemi-

sphere in more posterior electrodes. DLPFC-P15 was associated with cognitive performance in PwMS. Specifically, the latency of the DLPFC-P15 after stimulation on the left DLPFC showed a significant negative relationship with verbal learning and memory in the Selective Reminding Test, so that the shorter the latency the better the performance in the Long Term Storage and in the Consistent Long Term Retrieval. The amplitude of DLPFC-P15 was associated with the Symbol Digit Modalities Test (SDMT), assessing cognitive processing speed: the higher the DLPFC-P15, the poorer the performance in the SDMT. Finally, Word List Generation, a semantic verbal fluency task, was positively associated with the amplitude of DLPFC-P15 from the right hemisphere.

## CONCLUSIONS

This innovative multimodal approach was applied in MS for a direct assessment of CC functionality and its relationship with microstructural damage and behavioral outcomes. This project could have a direct impact on MS clinical research by providing a tool to monitor treatment effects with potential translation into clinical practice.

The improved understanding of CC functionality and “pathology” could improve the management of MS. Indeed, the study of the speed of interhemispheric information transfer through callosal fibers is of great interest. Our methodology could help shed light on the consequences of myelin degradation and the neuro-anatomical substrates of cognitive and sensorimotor impairments in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Bortoletto M, Bonzano L, Zazio A, Ferrari C, Pedullà L, Gasparotti R, Miniussi C, Bove M. Asymmetric transcallosal conduction delay leads to finer bimanual coordination. *Brain Stimul.* 2021; 14(2):379-388. doi: 10.1016/j.brs.2021.02.002
- Bonzano L, Bortoletto M, Zazio A, Iester C, Stango A, Gasparotti R, Miniussi C, Bove M. The hand motor hotspot for seed-based functional connectivity of hand motor networks at rest. *Front Neurosci.* 2022; 16:896746. doi: 10.3389/fnins.2022.896746. eCollection 2022
- Bonzano L, Bortoletto M, Zazio A, Iester C, Stango A, Gasparotti R, Miniussi C, Bove M. Seed-based resting-state functional connectivity of hand motor networks using the individual hand motor hotspot identified by TMS. *Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 12-16 novembre 2022*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 182.521,50 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years (extended by 9 months) and the amount of € 182,521.50

# Ruolo della demielinizzazione della sostanza grigia nel danno neuronale evidenziato con la Tomografia ad Emissioni di Protoni [11C] Flumazenil nella sclerosi multipla



## Giacomo Boffa

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

MENTORE/MENTOR

**Matilde Inglese**

MENTORE DELL'ISTITUTO OSPITANTE / MENTOR OF THE HOST INSTITUTE

**Bruno Stankoff, Sorbonne Université, Paris, France**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il danno della sostanza grigia gioca un ruolo predominante nel determinare la disabilità fisica e cognitiva delle persone con sclerosi multipla (SM). Diversi meccanismi patogenetici sono stati descritti come responsabili del danno della sostanza grigia, tra cui la presenza di lesioni focali, fenomeni di demielinizzazione diffusa ed alterazioni della connettività funzionale. La tomografia ad emissioni di positroni (PET), grazie alla sua eccellente specificità, è in grado di fornire importanti informazioni complementari alla risonanza magnetica (RM) nello studio del danno neuronale nella SM. La PET con 11C-flumazenil, un ligando del complesso recettoriale GABA-A presente su tutti i neuroni, è stata utilizzata per quantificare il danno neuronale in diverse patologie psichiatriche e neurologiche, compresa la SM. L'obiettivo di questo studio era di quantificare la densità dei recettori GABA-A della sostanza grigia nelle persone con SM e di valutarne l'associazione con i processi infiammatori focali e diffusi della sostanza grigia e le alterazioni della connettività funzionale.

## RISULTATI

Utilizzando un protocollo di saturazione parziale, siamo riusciti a quantificare la densità dei recettori GABA-A in 10 soggetti sani e 31 individui con SM. Non abbiamo trovato differenze significative in termini di densità del recettore GABA-A tra i due gruppi a livello corticale e dei nuclei profondi di sostanza grigia. Analizzando le lesioni corticali, abbiamo notato come la densità di recettore GABA-A fosse

significativamente inferiore all'interno delle lesioni corticali rispetto alla sostanza grigia di apparenza normale corrispondente. Le lesioni corticali presentavano tuttavia una grande eterogeneità in termini di densità del recettore GABA-A e alcune lesioni mostravano valori sovrapponibili a quelli della corteccia dei controlli sani. Abbiamo successivamente esplorato l'associazione spaziale tra la densità dei recettori GABA-A e la densità della connettività funzionale locale, un indice di centralità neuronale all'interno di un network, evidenziando alcune aree corticali a livello del precuneo, della corteccia cingolata posteriore, dei talami e della corteccia temporo-parietale caratterizzate da un'associazione diretta tra densità neuronale e maggiore centralità di connettività funzionale. Abbiamo infine trovato che un più alto grado di demielinizzazione corticale si associa ad una maggiore connettività neuronale locale. Anche in questo caso i valori di densità locale di connettività funzionale erano molto eterogeni, e per lo stesso grado di demielinizzazione corticale gli individui cognitivamente indenni avevano incrementi di connettività funzionale maggiori rispetto ai soggetti con deficit cognitivo.

## CONCLUSIONI

In questo studio non abbiamo evidenziato una diminuzione significativa di recettori GABA-A, che riflettono la densità neuronale, nei soggetti affetti da SM rispetto ai controlli sani. In studi precedenti sono state descritte sia diminuzioni sia incrementi della densità del recettore GABA-A nei soggetti con SM. Questi risultati contraddi-

tori possono essere giustificati in diversi modi. È possibile che la riduzione dei recettori GABA-A a livello corticale sia un fenomeno tardivo, identificabile solamente nelle forme avanzate di malattia. L'atrofia corticale, che viene frequentemente identificata nei soggetti con SM sin dall'esordio della malattia, potrebbe pertanto non essere una conseguenza esclusiva della perdita neuronale, ma altri meccanismi, tra cui la riduzione della matrice extra-cellulare e la diminuzione di astrociti e oligodendrociti, potrebbero svolgere un ruolo nel determinare la riduzione volumetrica della corteccia evidenziabile in RM. È altresì possibile che nelle fasi iniziali della malattia vi sia un incremento dell'espressione dei recettori GABA-A da parte dei neuroni, che maschera pertanto la quantificazione della densità neuronale valutata con la PET 11C-flumazenil. Infatti, diversi gruppi indipendenti hanno evidenziato un incremento significativo del recettore GABA-A nella corteccia di soggetti con SM rispetto ai controlli sani, e in uno studio questo aumento era associato ad un elevato grado di infiammazione corticale. È pertanto possibile ipotizzare che i fenomeni di infiammazione corticale possano indurre un incremento dei recettori GABA-A lungo i dendriti e il corpo cellulare neuronale. Questa ipotesi presenta numerose analogie con la teoria dei network di connettività neurona-

le, dove fenomeni di up-regolazione, di natura adattativa e mal-adattativa, sono ben descritti in risposta ad un danno strutturale. In linea con questa ipotesi, in questo studio abbiamo evidenziato come la densità dei recettori GABA-A correli spazialmente con la connettività locale in diverse aree corticali critiche all'interno dei networks neuronali a riposo. Studi longitudinali, attualmente in corso, saranno necessari per validare queste ipotesi.

Abbiamo inoltre evidenziato come la demielinizzazione corticale, fenomeno diffuso anche al di là delle lesioni corticali, induca un incremento della connettività funzionale a livello locale. Questo fenomeno, altamente eterogeneo tra i diversi soggetti, sembra svolgere un ruolo adattativo, in quanto soggetti cognitivamente indenni, a parità di demielinizzazione corticale presentano valori di connettività funzionale locale più elevati rispetto ai soggetti con deficit cognitivi. Infine, un risultato interessante di questo studio risiede nella dimostrazione che le lesioni corticali presentano valori di densità del recettore GABA-A molto eterogenei. È ben noto che le lesioni della sostanza bianca sono eterogenee in termini di processi demielinizzanti e infiammatori e questo potrebbe essere il caso anche per le lesioni corticali, aiutando a spiegare l'eterogeneità clinica dei soggetti con danno della sostanza grigia.

## Contribution of grey matter demyelination to neuronal damage evaluated with [11C] Flumazenil Positron Emission Tomography in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Grey matter (GM) damage is a key contributor of physical and cognitive disability in MS. Several pathological mechanisms have been described in the cortex of people with MS (PwMS), including focal and diffuse demyelination and functional connectivity alterations. Of interest, to which extent GM atrophy is driven by subtle inflammatory activity in the cortex is still a matter of debate. MRI techniques alone provide little value in this setting, being unable to distinguish in vivo neurodegenerative and inflammatory mechanisms in the GM, thus providing inaccurate surrogates of neural damage. Against this background, 11C-flumazenil positron emission tomography (PET) is a promising technique which has proven to be a sensitive quantitative marker to map the neuronal substrate of GM pathology in MS. The main objective of the study was to quantify and map 11C-flumazenil binding changes in the GM of MS subject with different clinical phenotypes, compared to healthy controls and to assess the contribution of focal and diffuse GM demyelination (focal cortical lesions and diffuse cortical demyelination) on neuronal damage and functional connectivity measures.

### RESULTS

Using 11C-flumazenil PET with a partial saturation protocol, we were able to quantify the density of GABA-A receptors in 10 HCs and 31 PwMS. No differences were detected in GABA-A receptor density between PwMS and HC in the total cerebral cortex, the deep grey matter nuclei, and the individual cortical lobes. We found that in PwMS, neuronal density within cortical GM lesions was significantly inferior compared to the corresponding normal appearing GM. A high heterogeneity was found within cortical lesions, with some lesions showing GABA-A receptor densities in the range of the cortex of the HCs. We explored the spatial association between GABA-A receptor density and local functional connectivity density, an index of neuronal hubness, and found some cluster of significant positive relationship between GABA-A density and local functional connectivity in the precuneus, posterior cingulate, thalami and parieto-temporal cortex. We also found that in PwMS, decreased myelin content was associated with significantly higher local functional connectivity density, reflecting enhanced neuronal local connectivity. For the same extent of cortical demyelination, functional

connectivity enhancement was very heterogeneous among patients, with cognitively preserved PwMS showing a significantly higher compensatory functional connectivity than cognitively impaired ones.

## CONCLUSIONS

In this study we did not find a significant decrease in grey matter neuronal density in PwMS compared to HCs. Our results are in line with some, but not all, studies using flumazenil-PET in PwMS, where both decrease and increase GABA-A receptor density have been described. It is possible that the reduction of GABA-A density is a late phenomenon, detectable in people with longer disease duration. Cortical atrophy, which is routinely seen in PwMS even in the early stages of the disease, might therefore be a consequence of several pathological mechanisms other than pure neuronal loss, such as the reduction of the extracellular matrix and/or the reduction of astrocytes and oligodendrocytes. Moreover, it is possible that in early MS, an upregulation of post-synaptic GABA-A receptors takes place along the dendrites and the neuronal soma, hindering the detection of neuronal loss using 11C-flumazenil PET. Other groups have indeed reported increased 11C-FMZ in PwMS compared to HC, which in one study was associated with increased microglia activation. Taken together, these results raise the possibility that diffuse cortical inflammatory processes induce an early up-regu-

lation of post-synaptic GABA-A receptors, which eventually fades away in the advanced phases of the disease. This hypothesis largely resembles the thesis of networks adaptive/maladaptive remodeling and network collapse, which is well-known in functional connectivity studies. In line with this hypothesis, we found that GABA-A receptor density has a similar topography to that of measures of neuronal functional connectivity, such as local functional connectivity density. Longitudinal studies, which are currently ongoing, are needed to confirm such preliminary hypotheses. We found that, although cortical lesions have less neuronal density than the corresponding normal appearing grey matter, a great heterogeneity in GABA-A receptor density exists within different cortical lesions. It is well established that white matter lesions are heterogeneous in terms of inflammatory infiltrates and myelin content, and this seems to be true also for cortical lesions, which show different degrees of neuronal loss.

Interestingly, our preliminary analysis on the relationship between cortical pathology and functional reorganization showed that decreased myelin content was associated with significantly higher local functional connectivity density, with higher levels associated with better cognitive outcomes. Globally, these results highlight the close interaction between cortical damage in terms of neuronal loss, demyelination, and functional adaptive changes.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Boffa G, Hamzaoui M, Lazzarotto A, Ricigliano V.G.A, Dubessy A.L., Shokri-Kojori E, Inglese M, Stankoff B, Bodini B. Increase in neuronal local connectivity following cortical demyelination prevents cognitive impairment in multiple sclerosis. Poster presentation at ECTRIMS 2022

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 80.400 €**  
Research Fellowship funded by FISM Grant 2018 for the period of 3 years and the amount of € 80,400

---

# **Verso nuovi trattamenti**

Towards new  
treatments

---

# Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario



## Maria Pia Abbracchio

Dipartimento di Scienze farmaceutiche, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Davide Lecca, Davide Marangon, Marta Fumagalli, Jacopo Angelini, Juliana Helena Castro E Silva, Donatella Caruso, Nico Mitro, Silvia Pedretti, Matteo Audano**

## INTRODUZIONE E OBIETTIVI

Il recettore GPR17 è un fattore cruciale nella mielinizzazione. Normalmente presente sulla superficie delle cellule progenitrici degli oligodendrociti fino alle fasi intermedie di maturazione, nelle fasi successive deve invece essere rimosso per consentire alle cellule di completare la loro maturazione e iniziare il processo di mielinizzazione vero e proprio. In studi precedenti, abbiamo osservato come interferenze con la riduzione fisiologica di GPR17 negli oligodendrociti immaturi blocchi le cellule a stadi intermedi impedendo la mielinizzazione. Eccessive quantità di recettore sulle cellule sono infatti state osservate in diversi modelli di SM e abbiamo ipotizzato che siano segnali di infiammazione locale di lunga durata a impedire il normale “silenzamento” del recettore durante la fase terminale di maturazione cellulare. Scopo di questo progetto è stato quindi quello di (i) comprendere gli eventi attivati dal silenziamento di GPR17 negli oligodendrociti in fase di maturazione, e (ii) analizzare lo stato di espressione di GPR17 in lesioni umane di SM.

## RISULTATI

Abbiamo utilizzato strategie chiamate “omiche”, in grado cioè di effettuare analisi globali su tutte le molecole presenti negli oligodendrociti durante le diverse fasi di maturazione in vitro. Invece di analizzare singoli geni, metaboliti e lipidi, abbiamo quindi analizzato l'intero genoma, metaboloma e lipidoma. Con questo approccio, abbiamo dimostrato che il silenziamento di GPR17 durante la maturazione dei progenitori oligodendrogliali induce un riarrangiamento profondo del metabolismo del glucosio, principale fonte di energia per le cellule, e della composizione

dei loro lipidi di membrana, che sono componenti essenziali per la sintesi di mielina. Questi effetti sono la conseguenza di marcati effetti a livello genico, mediati almeno in parte da un sostenuto aumento di LXR $\alpha$ , recettore nucleare coinvolto nella regolazione della sintesi dei lipidi. In parallelo, abbiamo dimostrato che il silenziamento di GPR17 può avvenire tramite l'effettiva rimozione fisica del recettore dalla membrana della cellula, grazie ad un processo noto come “internalizzazione”. Questi dati suggeriscono che il silenziamento di GPR17 rappresenti una tappa cruciale nella maturazione oligodendrocitaria e sia in grado di attivare lo spegnimento di geni tipici degli oligodendrociti precoci e di accensione dei geni coinvolti nella sintesi della mielina e nel suo supporto energetico.

Inoltre, il silenziamento di GPR17 induce gli oligodendrociti a rilasciare lattato, il substrato energetico preferito dai neuroni, svolgendo così un ruolo chiave nel supporto alla mielinizzazione. L'aumento del rilascio di lattato mediato da GPR17 contribuisce di per sé anche alla maturazione degli stessi oligodendrociti, esercitando così sia un effetto eterocrino (su altre cellule) che autocrino (sulle stesse cellule che lo producono).

Infine, grazie alla disponibilità di tessuti cerebrali post-mortem di pazienti con SM secondariamente progressiva forniti dalla MS Society Tissue Bank di Londra abbiamo valutato la distribuzione di GPR17 in lesioni attive, croniche inattive e croniche attive, confrontandola con la sostanza bianca apparentemente sana degli stessi pazienti. Le analisi hanno mostrato che alcune regioni di sostanza bianca ancora intatte e prive di lesioni mostravano già un significativo aumento di parametri infiammatori e un maggiore accumulo di GPR17, suggerendo che l'alterazione

patologica dell'espressione del recettore sono molto precoci ed innescate dall'infiammazione stessa. Stiamo ora mettendo a punto una procedura per effettuare analisi di proteomica, metabolomica e lipidomica su questi tessuti umani per valutare se presentino le stesse alterazioni omiche osservate negli oligodendrociti in vitro.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano un ruolo cruciale di GPR17 nei riarrangiamenti metabolici necessari a consentire il passaggio dalla fase di oligodendrocita immaturo a mielizzante; identificano il silenziamento di GPR17 come

il punto di controllo chiave per la corretta maturazione dell'oligodendrocita, svelando così ulteriori bersagli per il controllo farmacologico della SM. Mostrano anche, per la prima volta, che nelle persone con SM, GPR17 è già sovra-espresso in modo patologico quando iniziano a manifestarsi i primi segni di infiammazione all'interno del tessuto cerebrale ancora apparentemente sano e privo di lesioni. Questo suggerisce che GPR17, oltre ad essere di per sé un bersaglio farmacologico promettente, possa rappresentare anche un nuovo marcatore per l'identificazione precoce delle lesioni.

# Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17

## INTRODUCTION AND AIMS

The oligodendrocyte (OL) receptor GPR17 is a key actor in myelination. GPR17 is normally present on the external membrane of OL precursors and is needed for their maturation up to a certain stage; however, after cells reach the pre-OL stage, GPR17 has to disappear from the cell membrane in order to allow them to complete maturation and start myelination.

In previous studies, we provided evidence for abnormal upregulation of GPR17 in several animal models of demyelination and also showed that prevention of spontaneous GPR17 "silencing" in pre-OLs freezes cells at immature stages and impedes myelination. Based on these data, we hypothesized that, as a result of myelin disruption, local inflammatory signals initially act as a beneficial stimulus for GPR17 induction in early OL precursors to promote the generation of fully mature myelinating cells that can then repair lesions. However, when inflammation becomes chronic, excessive stimulation of GPR17 expression prevents its physiological silencing in maturing cells, ultimately resulting in blockade of cell maturation and of myelin synthesis.

Here, we aimed at (i) shedding light on the consequences of GPR17 silencing in maturing OLs; and (ii) analyzing the status of GPR17 in central nervous system samples from MS patients in comparison with healthy subjects.

## RESULTS

By applying transcriptomics, metabolomics and lipidomics approaches, we showed that, in maturing OLs, GPR17 silencing induces profound metabolic changes affecting both glucose (a main energy fuel for cells) and specific lipids (that are, in turn, essential for myelin synthesis).

GPR17 metabolic effects were exerted at gene level, as also shown by a marked increase of LXR $\alpha$  (liver X receptor alpha), a nuclear receptor involved in the regulation of lipid synthesis. In parallel, we also demonstrated that GPR17 silencing may occur via the actual removal of the receptor from the cell membrane, followed by its physical "internalization" inside the cytoplasm. Globally, these findings suggest that GPR17 disappearance from the cell membrane activates membrane-to-nucleus messages inducing the downregulation of pre-OLs genes as well as the activation of genes involved in myelin synthesis and necessary to support myelination energy requirements.

We also showed that GPR17 silencing induces maturing OLs to release lactate, a preferred energy substrate for neurons, to suggest a key role in shaping OL-neurite un-sheathing and myelination. Interestingly, besides acting heterocrinally, the increased lactate release also acted autocrinally, partially contributing to the OL maturation boost observed after GPR17 silencing.

Finally, the availability of post-mortem brain samples from patients with secondary progressive MS, kindly provided by the UK MS Society Tissue Bank, has allowed us to provide the first assessment of GPR17 distribution in active, chronic inactive, or chronic active human MS lesions, in parallel with GPR17 distribution in the normal appearing white matter (NAWM) of the same subjects and of healthy control individuals. Despite tissue integrity and lack of morphological abnormalities, significant signs of inflammation were found in the NAWM of MS subjects; interestingly, in line with the previously demonstrated aberrant overexpression of GPR17 in animal models of MS, in these areas we detected a marked increase of GPR17-expressing OLs. These results suggest that inflammatory events

are already ongoing in the NAWM of MS subjects along with early alterations of GPR17, which, as hypothesized, is likely overexpressed to react to inflammation itself. We are currently setting up a specific procedure to extend the proteomics, metabolomics, and lipidomics analysis to tissues drawn from the human lesions and from the NAWM of MS patients, in order to confirm the changes in energy metabolism and myelin lipid synthesis already detected on the cultured OLs.

## CONCLUSIONS

Globally, our results demonstrate an unprecedented role of GPR17 in the metabolic changes that are necessary to commit immature OLs to myelination, and highlight GPR17 silencing as a crucial checkpoint in oligodendrogenesis. They also confirm, for the first time in MS patients, that GPR17 is already abnormally upregulated under mild inflammatory conditions that are not yet associated to myelin disruption. Our data therefore unveil further targets for fostering myelin repair and also highlight GPR17 as a potential marker for early damage in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/Publications

- Marangon D, Boda E, Parolisi R, Negri C, Giorgi C, Montarolo F, Perga S, Bertolotto A, Buffo A, Abbracchio MP, Lecca D. In vivo silencing of miR-125a-3p promotes myelin repair in models of white matter demyelination. *Glia*. 2020 Oct;68(10):2001-2014. doi: 10.1002/glia.23819
- Marangon D, Boccazzi M, Lecca D, Fumagalli M. Regulation of Oligodendrocyte Functions: Targeting Lipid Metabolism and Extracellular Matrix for Myelin Repair. *J Clin Med*. 2020 Feb 8;9(2):470. doi: 10.3390/jcm9020470
- Rivera AD, Pieropan F, Chacon-De-La-Rocha I, Lecca D, Abbracchio MP, Azim K, Butt AM. Functional genomic analyses highlight a shift in Gpr17-regulated cellular processes in oligodendrocyte progenitor cells and underlying myelin dysregulation in the aged mouse cerebrum. *Aging Cell*. 2021 Apr;20(4):e13335. doi: 10.1111/accel.13335
- Angelini J, Marangon D, Raffaele S, Lecca D, Abbracchio MP. The distribution of GPR17-expressing cells correlates with white matter inflammation status in brain tissues of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 27;22(9):4574. doi: 10.3390/ijms22094574
- Marangon D, Abbracchio MP, Lecca D. Pathway-focused profiling of oligodendrocytes overexpressing miR-125a-3p reveals alteration of Wnt and cell-to-cell signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2021 Jan;41(1):105-114. doi: 10.1007/s10571-020-00836-z
- Daniele S, Saporiti S, Capaldi S, Pietrobono D, Russo L, Guerrini U, Laurenzi T, Kachoe E, Palazzo L, Russo V, Abbracchio MP, Eberini I, Trinca-velli ML. Functional Heterodimerization between the G Protein-Coupled Receptor GPR17 and the Chemokine Receptors 2 and 4: New Evidence. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 23;24(1):261. doi: 10.3390/ijms24010261

- Marangon D, Audano M, Pedretti S, Fumagalli M, Mitro N, Lecca D, Caruso D, Abbracchio MP. Rewiring of glucose and lipid metabolism induced by G protein-coupled receptor 17 silencing enables the transition of oligodendrocyte progenitors to myelinating cells. *Cells*. 2022 Aug 2;11(15):2369. doi: 10.3390/cells11152369
- Marangon D, Castro e Silva JH, Lecca D. Neuronal and Glial Communication via Non-Coding RNAs: Messages in Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 28;24(1):470. doi: 10.3390/ijms24010470.

### Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations

- Marangon D, Boda E, Negri C, Parolisi R, Giorgi C, Buffo A, Abbracchio MP, Lecca D. In vivo modulation of miR-125a-3p expression affects remyelination in the lysolecithin-induced demyelination. *More than Neurons 2*. Torino, November 29-December, 2018. Oral communication
- Lecca D, Marangon D, Boda E, Negri C, Parolisi R, Montarolo F, Perga S, Giorgi C, Buffo A, Abbracchio MP. MicroRNA-125a-3p fine-tunes oligodendroglial maturation and contributes to impaired re-myelination in multiple sclerosis. XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto (Portugal), July 10-13, 2019. Poster presentation
- Abbracchio MP. Purinergic modulation of myelin, a new target for neuroregenerative therapies. Opening Plenary Lecture: The Burnstock Lecture, First European Purine Meeting, Santiago de Compostela, September 4-6, 2019. Invited Lecture
- Lecca D, Marangon D, Boda E, Parolisi R, Negri C, Montarolo F, Perga S, Giorgi C, Buffo A, Abbracchio MP. Post-transcriptional regulation in oligodendrocytes: the strategy of miR-125a-3p. ESN Biennial meeting "Molecular mechanisms of regulation of the nervous system", Milan, September 1-4, 2019. Oral communication in symposium



- Marangon D, Negri C, Coppolino GT, Parravicini C, Eberini I, Viganò F, Fumagalli M, Furlan R, Dimou L, Lecca D, Abbracchio MP. Mechanisms driving oligodendrocyte precursor cells to myelinating oligodendrocytes: focus on the P2Y-like receptor GPR17. XVIII SINS Congress. Perugia, September 26-29, 2019. Oral communication
- Abbracchio MP. InnovationFlow and the players for translational research, 39° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Florence, Nov. 20-23, 2019. Invited Lecture
- Abbracchio MP. Dal banco di laboratorio al paziente: nuovi modelli sostenibili per la ricerca e sviluppo di nuove medicine. Giornata Associazione Farmaceutici Industria (AFI), Milan, February 13, 2020. Plenary Lecture
- Abbracchio MP. Why haven't we cured neurodegenerative diseases? An analysis of what we need to really change the history of these diseases. Multifactorial approach in drug discovery for neurodegenerative diseases. Innovative Research in Pharmaceutical and Environmental Sciences (IRPES), University of Pisa (online) December 4, 2020. Opening Plenary Lecture
- Lecca D. Characterization of a novel miRNA involved in myelination: a new potential pathogenetic mechanism in multiple sclerosis. 40° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, (online) March 9-13, 2021. Oral presentation in symposium
- Abbracchio MP. Why haven't we cured neurodegenerative diseases? An analysis of what we need to really change the history of these diseases. Scuola Universitaria Superiore Sant'Anna, Pisa, June 9, 2021, Invited Lecture
- Abbracchio MP. GPR17, a new molecular target for remyelinating therapies in MS. 56° Congresso AINPeNC e 46° Congresso AIRIC - Digital Congress, October 28-30, 2021. Invited speaker
- Marangon D, Audano M, Pedretti S, Fumagalli M, Mitro N, Lecca D, Caruso D, Abbracchio MP. GPR17 downregulation modulates lactate production and secretion rewiring glucose metabolism during OPC maturation. Annual Purine Club meeting (online), January 28, 2022. Oral presentation
- Marangon D, Boda E, Negri C, Parolisi R, Giorgi C, Buffo A, Abbracchio MP, Lecca D. MiR-125a-3p negatively regulates oligodendrocyte precursor cell maturation altering several pro-myelinating signaling pathways. 17th SIBBM Seminar - Frontiers in Molecular Biology: The RNA World 3.0, Rome, June 20-22, 2022. Poster presentation
- Lecca D, Marangon D, Boda E, Negri C, Parolisi R, Giorgi C, Buffo A, Abbracchio MP. Inhibition of miR-125a-3p improves myelin repair in animal models of multiple sclerosis. 17th SIBBM Seminar - Frontiers in Molecular Biology: The RNA World 3.0, Rome, June 20-22, 2022. Poster presentation
- Marangon D, Audano M, Pedretti S, Fumagalli M, Mitro N, Lecca D, Caruso D, Abbracchio MP. Rewiring of glucose and lipid metabolism induced by GPR17 silencing enables the transition of oligodendrocyte progenitors to myelinating cells. More than neurons 3, Turin, December 15-17, 2022. Poster presentation
- Abbracchio MP. Targeting myelin and oligodendrocyte dysfunction: new hopes and challenges for treating neurodegenerative diseases. VII International Symposium on neurochemistry and pathophysiology of the glial cell. XI Symposium of update on pharmacology at UFBA, Federal University of Bahia, Salvador, October 11-14, 2022. Invited Lecture
- Abbracchio MP. "Targeting myelin in neurodegenerative diseases: focus on GPR17, a key regulator of oligodendrocyte function", Campus di ricerca IEO-IFOM-IIT, Milano, in preparation, February 27, 2023, Invited speaker

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 24 mesi) e l'ammontare di 189.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 24 months) and the amount of € 189,000

# Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17: un bersaglio innovativo per terapie di rimielinizzazione nella sclerosi multipla



## Maria Letizia Trincavelli

*Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Simona Daniele, Deborah Pietrobono, Lara Russo**

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

**Ivano Eberini, Chiara Parravicini, Luca Palazzolo**, *Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

**Stefano Capaldi, Elham Ataie Kachoie**, *Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona, Italia*

**Massimo Degano, Paola Tornaghi, Paolo G. Cocomazzi, Marco Patrone**, *Unità di Biocristallografia IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia degenerativa e progressiva del sistema nervoso centrale che si caratterizza per la distruzione e perdita di funzionalità di un particolare tipo di cellule, gli oligodendrociti, cellule responsabili della produzione della mielina che costituisce il rivestimento protettivo dei neuroni. Ad oggi non esistono terapie capaci di guarire tale patologia, ma sono disponibili diversi trattamenti mirati a ridurre la progressione e la gravità favorendo il recupero dalla disabilità progressiva, che è tipica delle varie forme della malattia.

Una potenziale strategia per il trattamento della SM potrebbe essere quello di proteggere la mielina aumentando la riparazione cellulare, stimolando gli oligodendrociti nel produrla o favorendo il differenziamento dei precursori degli oligodendrociti (OPC) verso cellule capaci di produrre mielina.

Negli ultimi anni il nostro gruppo di ricerca ha identificato una proteina presente negli OPC, il GPR17, la quale svolge un ruolo importante nel processo di mielinizzazione e può costituire pertanto un bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento di patologie neurodegenerative. Sulla base di questi presupposti, obiettivo del presente progetto è stato quello di studiare la struttura della proteina GPR17, al fine di chiarire i requisiti strutturali necessari per l'interazione della proteina stessa con molecole da

sviluppare come potenziali agenti farmacologici per il trattamento della patologia. Chiarire infatti la struttura di una proteina costituisce il punto di partenza per poter comprendere il meccanismo di azione della proteina a livello molecolare e per poter disegnare e sviluppare molecole capaci di legare la proteina ed attivarla innescando delle specifiche risposte biologiche.

In particolare, unendo le competenze di diversi gruppi di ricerca in biochimica, biologia molecolare, struttura di proteine e simulazioni al computer di molecole, è stata studiata la struttura (ossia, la forma più dettagliata) della proteina GPR17 aprendo la strada verso lo sviluppo di nuove molecole quali potenziali farmaci che possano riparare il danno al sistema nervoso tipico delle diverse forme di sclerosi multipla.

## RISULTATI

Obiettivo principale del presente progetto è stato quello di sviluppare, tramite tecniche di biologia molecolare, delle varianti ingegnerizzate di GPR17 da poter utilizzare per la cristallizzazione e la determinazione della struttura tridimensionale della proteina, il cui ottenimento è cruciale per studiare l'interazione proteina-ligando e sviluppare nuove molecole come potenziali farmaci per la SM. Il raggiungimento di tale obiettivo è stato reso possibile da una ricerca multidisciplinare che ha coinvolto tre diversi centri

di ricerca con competenze complementari in analisi computazionale e di simulazione molecolare, analisi strutturali e biochimiche, nonché competenze di biologia molecolare per la produzione di varianti ingegnerizzate della proteina. In particolare, attraverso l'ottimizzazione di protocolli di espressione e purificazione, sono state prodotte ed espresse in cellule, diverse varianti del recettore GPR17 ottenute mediante modificazioni delle regioni N- o C- terminale della sequenza amminoacidica o tramite la costruzione di proteine chimeriche ottenute con l'inserzione di sequenze particolari nei loop intracellulari, una strategia che si è mostrata vincente in altri studi di cristallizzazione di altri recettori accoppiati a proteine G. Tutte le varianti prodotte sono quindi state espresse in cellule eucariotiche e caratterizzate da un punto di vista funzionale mediante saggi biochimici, al fine di verificare che le modifiche effettuate non alterassero la funzionalità del recettore. Le varianti più promettenti in termini di stabilità e funzionalità, sono state selezionate e sono stati messi a punto protocolli per avviare la produzione in larga scala da utilizzare in prove di cristallizzazione. In parallelo, lo studio della struttura del recettore e dei residui amminoacidici funzionali al legame della proteina con molecole ad attività agonista/antagonista è stato approntato anche mediante studi di modellistica molecolare che ci hanno consentito di chiarire l'importanza di specifici residui am-

minoacidici della proteina nella stabilizzazione del recettore nella sua forma attiva.

Nell'ambito del presente progetto è stata inoltre sviluppata una metodologia rapida e affidabile per misurare l'attività di nuovi composti attivi sul recettore GPR17 in processi di screening di nuove molecole. Tale tecnica risulta particolarmente utile per studi di attività di nuove molecole e favorire l'identificazione di nuovi potenziali agenti farmacologici.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente progetto hanno permesso di ottimizzare protocolli di ingegnerizzazione e purificazione di varianti della proteina GPR17 identificando costrutti potenzialmente funzionali alla cristallizzazione della proteina. Inoltre i risultati ottenuti attraverso metodiche di simulazione computazionale e saggi biochimici in vitro, hanno permesso di ottenere utili informazioni sui requisiti strutturali importanti nel garantire l'interazione della proteina con molecole potenzialmente attive. La comprensione delle caratteristiche strutturali della proteina, insieme allo sviluppo di tecniche rapide di screening di attività di nuove molecole, costituiscono un importante strumento per il disegno e la progettazione di molecole attive e sviluppabili come nuovi potenziali farmaci per il trattamento della SM.

# Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a degenerative and progressive disease of the central nervous system, characterized by the destruction and loss of function of a particular type of cells, the oligodendrocytes, that are responsible of the production of myelin, a protecting covering of neurons. To date, there are no therapies for this disease, but several treatments are available that aim to reduce its progression and severity promoting the recovery from the progressive disability that is typical of the different forms of the disease. One potential strategy for treating MS could be to protect myelin by increasing cellular repair, stimulating its production from the oligodendrocytes, or promoting the differentiation of oligodendrocyte precursors (OPCs) into cells capable of producing myelin. In recent years, our research group has identified a protein present in OPCs, GPR17, assessing its crucial role in the myelination process so suggesting it as a target for the development of new drugs for the treatment of neurodegenerative diseases. Based on these results, the aim of this project was to study the struc-

ture of the GPR17 protein, in order to clarify the key residues and interactions that dictate agonist and antagonist activities in order to develop potential active agents for the treatment of the disease. Clarifying the structure of a protein is in fact the starting point for the understanding of protein mechanism of action at the molecular level and for the design and develop of molecules capable of binding the protein triggering specific biological responses. By combining the different skills of several research groups in biochemistry, molecular biology, protein structure and in silico molecular modelling, the structure (i.e., the most detailed form) of the GPR17 protein was studied, paving the way for the development of new molecules as potential drugs that can repair the damage to the nervous system typical of the various forms of multiple sclerosis.

## RESULTS

The main objective of this project was to develop, by the means of molecular biology techniques, new engineered variants of GPR17 suitable for receptor crystallization, and

then the determination of the protein's three-dimensional structure, that is a crucial starting point for studying protein-ligand interaction and for the development of new molecules as potential drugs for MS. The achievement of this goal was possible by a multidisciplinary research approach, involving three different centers with complementary expertise in computational analysis and molecular simulation, structural and biochemical analysis, as well as molecular biology skills for the production of engineered variants of the protein. Through the optimization of expression and purification protocols, several variants of the GPR17 receptor were produced and expressed in cells; these protein variants were obtained by modification of the N- or C-terminal regions of the amino acid sequence or by the construction of chimeric proteins obtained by insertion of sequences into intracellular loops, a strategy that has proved successful in other G-protein-coupled receptor crystallization studies. All the variants produced were then expressed in eukaryotic cells and characterized from a functional point of view by biochemical assays, in order to verify that the modifications did not alter the functionality of the receptor. The most promising variants in terms of stability and functionality were selected and protocols were developed to start large-scale production to be used in crystallization assays. In parallel, the study of the structure of the receptor

and of the amino acid residues required for protein-agonist/antagonist molecules binding was also investigated by *in silico* molecular modelling studies, which allowed us to clarify the importance of specific amino acid residues of the protein in stabilizing the receptor in its active form.

As part of this project, a rapid and reliable methodology was also developed to measure the activity of new compounds towards GPR17. This technique is particularly useful for rapid screening of the activity of new molecules and for the identification of potential new pharmacological agents.

## CONCLUSIONS

The results obtained in this project allowed the optimization of new protocols for the engineering and purification of GPR17 protein variants, identifying constructs potentially functional for protein crystallization. In addition, molecular modelling studies and *in vitro* biochemical assays gave us useful information on the structural requirements dictating the binding of agonists/antagonists to receptor protein. The understanding of the structural characteristics of the protein, together with the development of a rapid and reliable assay for rapid screening of new molecule pharmacological activity, constitute an important tool for the design and development of active molecules for the treatment of MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- 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, 7, 910.
- Daniele S, Saporiti S, Capaldi S, Pietrobono D, Russo L, Guerrini U, Laurenzi T, Ataie Kachoie E, Palazzolo L, Russo V, Abbracchio M.P, Eberini I, Trincavelli M.L. *Functional Heterodimerization between the G Protein-Coupled Receptor GPR17 and the Chemokine Receptors 2 and 4: New Evidence. Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 261.
- Pietrobono D, Daniele S, Parravicini C, Eberini I, Martini C, Trincavelli ML. *Physical and functional interaction between GPR17 and chemokine receptor 2: a promising tool for managing remyelination. Poster P.47. First European Purine Meeting, Santiago de Compostela, 4-6 September 2019*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) per l'ammontare di 235.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 12 months) and the amount of € 235,000

# Caratterizzazione e manipolazione delle vie metaboliche responsabili di neuroinfiammazione cronica



## Stefano Pluchino

*Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, UK*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Luca Peruzzotti-Jametti, Cory M Willis**

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

**Angelo D'Alessandro**, *Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado, Denver, USA*

**Antonio Bertolotto**, *Neurologia, Centro Riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CreSM), Torino, Italia*

**Michael Murphy**, *Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, UK*

**Christian Frezza**, *CECAD Research Center, University of Cologne, Cologne, Germany*

**Carlo Viscomi**, *Dipartimento di Scienze Biomediche e Centro di Neuroscienze, Università degli Studi di Padova, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nella sclerosi multipla progressiva (SM-P) l'accumulo del danno al sistema nervoso centrale (SNC) è causato da una diffusa infiltrazione e attivazione di fagociti mononucleati (FM), come la microglia e i macrofagi. È stato dimostrato che in condizioni pro-infiammatorie il metabolismo cellulare guida l'attivazione dei FM, che passano a uno stato glicolitico aerobico accumulando grandi quantità di intermedi del ciclo dell'acido citrico. Tra questi, l'immunometabolita succinato gioca un ruolo chiave. L'ossidazione del succinato da parte del complesso mitocondriale II succinato deidrogenasi (SDH) porta alla produzione di dannose specie reattive dell'ossigeno mitocondriale (ROS) dal complesso mitocondriale I (NADH ubiquinone ossidoreduttasi). Inoltre, il succinato funge da segnale intracellulare ed extracellulare per sostenere l'induzione di citochine pro-infiammatorie.

Qui abbiamo ipotizzato che il metabolismo dei macrofagi e della microglia potrebbe essere un obiettivo terapeutico per trattare la neuroinfiammazione cronica e che la sua manipolazione porterà a nuove opportunità per bloccare la progressione nella SM.

Nell'ambito di questo progetto si è voluto indagare:

(OBIETTIVO 1) Il ruolo del metabolismo dei FM nei cambiamenti osservati in modelli animali di neuroinfiammazione.

(OBIETTIVO 2) I determinanti metabolici dell'infiammazione del SNC nelle persone con SM.

(OBIETTIVO 3) Nuovi interventi farmacologici volti a

manipolare il metabolismo delle cellule immunitarie per bloccare il danno secondario nella neuroinfiammazione cronica.

## RISULTATI

(OBIETTIVO 1) Abbiamo completato questo obiettivo utilizzando un approccio multi-omico che ci ha aiutato ad identificare un nuovo stato molecolare/metabolico che perpetua l'attivazione dei FM attraverso l'attività del complesso mitocondriale II e del complesso I che guida la produzione di ROS. Il blocco di questo stato nei FM utilizzando topi transgenici ha protetto il sistema nervoso centrale dai danni neurotossici e ha migliorato gli esiti funzionali del modello sperimentale di encefalomielite autoimmune (EAE).

(OBIETTIVO 2) Abbiamo studiato la composizione metabolica del liquido cerebrospinale (CSF) e del sangue di pazienti affetti da SM in diversi stadi della malattia. I nostri dati suggeriscono che specifici metaboliti (inclusi il succinato e il fumarato) sono regolati in modo diverso nel CSF di persone con SM-P rispetto a quelle persone con SM a cadute e remissioni. Abbiamo scoperto che questo profilo metabolico alterato è correlato all'attività della malattia e ci permette di identificare con una probabilità > 90% se un paziente è progredito nella fase progressiva secondaria della malattia.

(OBIETTIVO 3) Abbiamo completato diversi studi in vivo volti a studiare la biodistribuzione e l'efficacia terapeutica degli inibitori del complesso I e/o II. Questi esperimenti ci

hanno permesso di identificare la via corretta di somministrazione del farmaco per ottenere il massimo accumulo nel SNC. Successivamente abbiamo testato questi farmaci nel modello murino EAE ed eseguito analisi immunologiche e patologiche, che supportano l'ulteriore utilizzo di alcune di queste molecole nelle persone con SM-P.

## CONCLUSIONI

Sviluppo di una terapia: i nostri dati dimostrano che analizzando il modello EAE di SM e campioni biologici di pazienti, è possibile identificare uno stato metabolico della

neuroinfiammazione che può essere utilizzato per sviluppare nuovi interventi farmacologici per modificare il metabolismo nelle cellule immunitarie. Abbiamo scoperto che il blocco del danno indotto dal succinato (utilizzando strumenti transgenici o molecole mirate al complesso mitocondriale I e/o II) è una strada promettente per ridurre l'infiammazione persistente del SNC. I nostri dati mostrano che la disfunzione mitocondriale dei FM può essere trattata per prevenire il danno secondario causato dall'infiammazione cronica del SNC.

# Characterisation and manipulation of the metabolic pathways driving chronic neuroinflammation

## INTRODUCTION AND AIMS

In progressive multiple sclerosis (P-MS) the accumulation of central nervous system (CNS) damage is driven by a diffuse infiltration of inflammatory mononuclear phagocytes (MPs). It has been shown that cell metabolism drives the activation of proinflammatory MPs, which switch to an aerobic glycolytic state accumulating large amounts of TCA cycle intermediates. Among these, the immunometabolite succinate plays a key role in inflammatory MPs. Succinate oxidation by the mitochondrial complex II succinate dehydrogenase (SDH) leads to the production of harmful mitochondrial (mt) reactive oxygen species (ROS) from the mitochondrial complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase). Moreover, succinate acts as a key intracellular and extracellular signal to sustain the expression of proinflammatory cytokines.

Here we hypothesised that the metabolism of macrophages and microglia could be a main therapeutic target to treat chronic neuroinflammation and anticipate that its manipulation will lead to new opportunities to block progression in MS.

Within this project, we aimed to investigate:

(AIM 1) The role of MPs in modulating the metabolic changes observed in animal models of neuroinflammation.

(AIM 2) The metabolic determinants of CNS inflammation in people with MS.

(AIM 3) Novel pharmacological interventions aimed at manipulating the metabolism of immune cells to block secondary damage in chronic neuroinflammation.

## RESULTS

(AIM 1) We completed this aim using a multiomics approach that helped us to identify a new molecular signature that perpetuates the activation of MPs through mitochondrial complex II and complex I activity driving the production of ROS. Blocking this pathway in pro-inflammatory MPs

using transgenic tools protected the CNS against neurotoxic damage and improved functional outcomes of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal disease model of MS.

(AIM 2) We studied the metabolic composition of the cerebrospinal fluid (CSF) and blood obtained from MS patients at different stages of disease. Our data suggest that specific metabolites (including succinate and fumarate) are differentially regulated in the CSF of P-MS compared to patients with relapsing remitting MS. We found that this altered metabolic profile correlates with disease activity and has allowed us to identify with >90% probability if a patient has progressed into the secondary progressive phase of disease.

(AIM 3) We completed several in vivo studies aimed to investigate the biodistribution and therapeutic efficacy of complex I and/or II inhibitors. These experiments allowed us to identify the proper route of drug administration to achieve maximum drug delivery to the CNS. We next tested these drugs in the EAE mouse model and performed immunological and pathological analyses, which support the further testing of some of these molecules in people with P-MS.

## CONCLUSIONS

Proximity to cure: our data show that by analysing the EAE mouse model of MS and biological samples from patients, a metabolic signature of neuroinflammation can be identified, which can be used to develop novel pharmacological intervention that target metabolism in innate immune cells. We found that blocking succinate-induced damage (either using transgenic tools or small molecules targeting mitochondrial complex I and/or II) is a promising avenue to reduce the persistent CNS inflammation. Our data show that the mitochondrial dysfunction of MPs can be targeted to prevent the secondary neural damage caused by chronic CNS inflammation.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/Publications

- Peruzzotti-Jametti L, Pluchino S. Targeting Mitochondrial Metabolism in Neuroinflammation: Towards a Therapy for Progressive Multiple Sclerosis. *Trends Mol Med*, 2018 Oct;24(10):838-855, doi: 10.1016/j.molmed.2018.07.007
- Cunniffe N, Vuong KA, Ainslie D, Baker D, Beveridge J, Bickley S, Camilleri P, Craner M, Fitzgerald D, de la Fuente AG, Giovannoni G, Gray E, Hazlehurst L, Kapoor R, Kaur R, Kozlowski D, Lumicisi B, Mahad D, Neumann B, Palmer A, Peruzzotti-Jametti L, Pluchino S, Robertson J, Rothaul A, Shellard L, Smith KJ, Wilkins A, Williams A, Coles A. Systematic approach to selecting licensed drugs for repurposing in the treatment of progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, doi: 10.1136/jnnp-2020-324286.
- Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Manferrari G, Rogall R, Fernandez-Vizarra E, Williamson J, Braga A, Van den Bosch A, Leonardi T, Kittel A, Beninca C, Vicario N, Tan S, Bastos C, Bicci I, Iraci N, Smith JA, Lehner P, Buzás E, Faria N, Zeviani M, Frezza C, Brisson A, Matheson N, Viscomi C, Pluchino S. Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. *Plos Biology*, 2021, doi: 10.1371/journal.pbio.3001166.
- Krzak G, Willis CM, Smith JA, Pluchino S, and Peruzzotti-Jametti L. Succinate Receptor 1: An Emerging Regulator of Myeloid Cell Function in Inflammation. *Trends in Immunology*, 2021, doi: 10.1016/j.it.2020.11.004.
- Peruzzotti-Jametti L, Willis CM, Hamel R, Krzak G, Pluchino S. Metabolic Control of Smoldering Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.705920.
- Hamel R, Peruzzotti-Jametti L, Ridley K, Testa V, Yu B, Rowitch D, Marioni JC, Pluchino S. Time-resolved single-cell RNAseq profiling identifies a novel *Fabp5*-expressing subpopulation of inflammatory myeloid cells in chronic spinal cord injury. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.21.346635>.

### Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations

- Luca Peruzzotti-Jametti UK Society for Extracellular Vesicles (UKEV) meeting 2018, The University of Sheffield, UK
- Luca Peruzzotti-Jametti and Stefano Pluchino. Annual Scientific Congress Italian MS Society and 11th World MS day 2019, Rome, Italy
- Luca Peruzzotti-Jametti, and Stefano Pluchino XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2019, Centro de Congressos da Alfândega do Porto, Portugal
- Luca Peruzzotti-Jametti. Kick-off Symposium of Advanced Graduate Program for Future Medicine and Health Care 2019, Tohoku University, Japan
- Luca Peruzzotti-Jametti. Recent Trends in CNS Regenerative Medicine, Workshop for PhD students. University of Minho, Portugal
- Luca Peruzzotti-Jametti and Stefano Pluchino. Annual Scientific Congress Italian MS Society 2020 (virtual)
- Luca Peruzzotti-Jametti. UK Society for Extracellular Vesicles (UKEV) meeting 2020 (virtual).
- Luca Peruzzotti-Jametti. Models in genetic disease research 2021 (Université de Paris, FR and Univ. of Padova, Italy) (virtual)
- Luca Peruzzotti-Jametti and Stefano Pluchino. Annual Scientific Congress Italian MS Society 2021, Rome, Italy
- Luca Peruzzotti-Jametti .Beyond the Neuron seminars 2021, Cambridge, UK.
- Luca Peruzzotti-Jametti and Stefano Pluchino. Regenerative Neuroimmunology Neurowebinars 2021 (virtual)
- Luca Peruzzotti-Jametti and Stefano Pluchino. Speaker and symposium chair European Glial Meeting 2021 (virtual)
- Luca Peruzzotti-Jametti. Brain Connectomics Throughout the Lifecourse 2022 Cambridge, UK
- Luca Peruzzotti-Jametti. Cambridge Center for Myelin Repair – kickoff symposium 2022 Cambridge, UK

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 347.976 €**  
Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 3 years and the amount of € 347,976

# Identificazione e validazione dei target rimielinizzanti di edaravone nei progenitori degli oligodendrociti



## Cristina Agresti

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Caterina Veroni, Alessia Formato, Silvia Corbisiero**

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

**Pierfausto Seneci, Eleonora Colombo**, Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

**Stefania Olla**, Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Monserrato, Italia

**Giovanna Mobbili, Cristina Minelli**, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, Ancona, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le terapie attualmente disponibili per la sclerosi multipla (SM) sono efficaci nel controllare la componente infiammatoria della malattia, ma non riescono a prevenire la continua perdita di assoni e neuroni che porta alla disabilità neurologica permanente. La riparazione del danno alla guaina di mielina, che circonda gli assoni e permette la propagazione del segnale nervoso, è inadeguata nella SM soprattutto nelle fasi più avanzate della malattia. La generazione di nuovi oligodendrociti che producono mielina richiede il differenziamento di una popolazione di cellule gliali, le cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC). L'identificazione di farmaci in grado di indurre il differenziamento degli OPC presenti nelle aree danneggiate in oligodendrociti rimielinizzanti rappresenta un'opportunità per il trattamento della SM volto a promuovere la riparazione dei tessuti.

Attraverso l'analisi di una libreria contenente farmaci utilizzati per altre malattie, abbiamo precedentemente identificato un composto, l'edaravone, in grado di promuovere i processi di riparazione della mielina, che è utilizzato come agente neuroprotettivo per il trattamento dell'ictus e/o della sclerosi laterale amiotrofica in Giappone, Stati Uniti e Canada. L'attività di un farmaco è determinata dalla sua interazione con bersagli proteici cellulari. Poiché la maggior parte dei farmaci interagisce con più di un bersaglio proteico, esiste la possibilità che la nuova attività di un farmaco sia mediata da bersagli diversi da quelli per cui è stato approvato. L'obiettivo di questo progetto è identificare i bersagli pro-

teici attraverso i quali l'edaravone esercita la sua attività rimielinizzante utilizzando un approccio di medicinal chemistry che prevede la progettazione e la sintesi di derivati chimici marcati di edaravone in associazione a tecniche di fishing del bersaglio e di identificazione delle proteine. Questi studi sono indispensabili per progettare interventi terapeutici più efficaci.

## RISULTATI

Abbiamo innanzitutto effettuato la progettazione e la sintesi di 28 nuovi derivati di edaravone, tra cui cinque sonde contenenti gruppi reattivi marcati, con l'obiettivo di identificare sostituzioni conformi alla conservazione dell'attività biologica. La validazione dell'attività dei composti in colture di OPC di topo ha mostrato che nessuno dei derivati marcati è in grado di mantenere la capacità pro-differenziativa, evidenziando che la struttura molecolare di edaravone non è compatibile con un approccio che prevede l'uso di sonde chimiche. Abbiamo poi applicato una strategia di ricerca di bersagli farmacologici basata sull'analisi differenziale del profilo di espressione genica in cellule esposte o meno a un farmaco per identificare le vie di segnalazione proteica che vengono attivate. Abbiamo individuato 1132 geni regolati in modo differenziale in OPC di topo trattati con edaravone rispetto ai controlli. L'analisi bioinformatica dei dati di espressione genica ha mostrato che tra i geni più regolati sono presenti molti geni appartenenti alla via di segnalazione del citocromo p450

1 (CYP1). La capacità di edaravone di attivare il pathway di CYP1 è stata poi confermata in OPC di topo e nella linea cellulare di neuroblastoma umano SHSY-5Y mediante real-time RT-PCR. Il principale induttore di questa via di segnalazione è un fattore di trascrizione attivato da ligandi specifici che agisce come regolatore fisiologico del differenziamento cellulare ed è coinvolto nei processi di mielinizzazione. Per verificare l'ipotesi che edaravone agisca come ligando di questo fattore di trascrizione, abbiamo valutato la loro capacità d'interazione e l'energia di legame mediante un approccio computazionale (docking molecolare), dimostrando una buona affinità di legame tra le due molecole. Sono attualmente in corso studi per dimostrare la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione indotta da edaravone in cellule OPC e

SHSY-5Y e la stimolazione della mielinizzazione mediata dalla via di CYP1 nel modello Zebrafish. Inoltre, la validazione di ulteriori pathway genetici regolati da edaravone consentirà di definire la rete di segnalazione del farmaco negli OPC.

## CONCLUSIONI

Il nostro approccio di riposizionamento di farmaci, focalizzato sullo studio dei meccanismi d'azione di edaravone, ha permesso di identificare un nuovo bersaglio molecolare del farmaco legato al processo di formazione della mielina. Questi risultati supportano lo sviluppo di edaravone come composto con attività rimielinizzante nel trattamento della SM e di altre malattie demielinizzanti.

# Identification and validation of edaravone remyelinating targets in oligodendrocyte progenitor cells

## INTRODUCTION AND AIMS

Current MS treatments are effective in controlling the inflammatory component of the disease, but fail in preventing the continuous loss of axons and neurons that leads to a permanent neurological disability. The repair of damage to the myelin sheets that surround axons and allow the propagation of nerve signal is inadequate in MS, particularly in the more advanced stages of the disease. The generation of new myelin-forming oligodendrocytes involves the differentiation of a population of glial cells, the oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). The identification of drugs capable of inducing the differentiation of OPCs present within damaged areas into remyelinating oligodendrocytes represents an opportunity for MS treatment aimed to promote tissue repair.

By screening a library containing drugs in use for other diseases, we have previously identified a compound, edaravone, able to promote myelin repair processes, which is used as neuroprotective agent for the treatment of stroke and/or amyotrophic lateral sclerosis in Japan, USA and Canada. Interaction with cellular protein targets is the way through which a drug exerts its pharmacological activity. As most drugs interact with more than one protein target, the possibility exists that the new activity of a drug is mediated by targets that differ from those for which it was approved.

The aim of this project is to identify the protein targets through which edaravone elicits its remyelinating activity using an approach of medicinal chemistry that involves the design and synthesis of tagged chemical derivatives of edaravone combined with techniques of target fishing and

protein identification. These studies are indispensable for designing more effective therapeutic interventions.

## RESULTS

We first carried out the design and synthesis of 28 new edaravone derivatives, including five probes containing the tagged-reactive groups, with the aim of identifying substitutions compliant with preservation of biological activity. Validation of compounds activity in mouse OPC cultures showed that none of the tagged-constructs retained the pro-differentiative capability, proving that the molecular structure of edaravone is not compatible with an approach employing chemical probes.

We next applied a drug target discovery strategy based on the analysis of the expression level of genes differentially regulated in cells exposed or not to a drug to pinpoint drug-induced protein network. We identified 1132 genes differentially regulated in edaravone treated mouse OPCs compared to controls. Bioinformatic analysis of gene expression data showed that several genes belonging to the signaling pathway of cytochrome p450 1 (CYP1) are among the most regulated genes. The ability of edaravone to activate CYP1 gene pathway was next confirmed in mouse OPCs and human neuroblastoma cell line SHSY-5Y by real-time RT-PCR. The main trigger of this cellular pathway is a ligand-activated transcription factor that acts as physiological regulator of cell differentiation and has been shown to be involved in myelination processes. To test the hypothesis that edaravone acts as a ligand of this transcription factor, we assessed their interaction ability and binding energy by a computational approach

(molecular docking), predicting a good binding affinity between the two molecules. Studies are in progress to prove edaravone-induced nuclear translocation of the transcription factor in OPCs and SHSY-5Y cells, and CYP1 pathway-mediated stimulation of myelination in Zebrafish model. Furthermore, validation of additional genetic pathways regulated by edaravone will allow the drug's signaling network in OPC to be defined.

## CONCLUSIONS

Our drug repositioning approach focused on investigating edaravone mechanisms of action enabled to identify a novel molecular target of the drug related to the process of myelin formation. These findings support the development of edaravone as a compound with remyelinating activity in the treatment of MS and other demyelinating diseases.



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

- XV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, online, July 5-9 2021

#### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2017 per il periodo di 2 anni (prorogato di 24 mesi) e l'ammontare di 109.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2017 for the period of 2 years (extended by 24 months) and the amount of € 109,000

# La differente risposta di precursori oligodendrocitari e oligodendrociti immaturi alla demielinizzazione: implicazioni per nuove strategie rimielinizzanti



## Marta Boccazzi

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

MENTORE/MENTOR  
**Marta Fumagalli**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è caratterizzata da un danno agli oligodendrociti (OL) che formano la guaina mielinica e dalla sua conseguente distruzione. I farmaci immunosoppressori e immunomodulatori attualmente in uso sono in grado di attenuare la degenerazione della mielina, ma non sono utili nella forma "progressiva" della malattia, dove la generazione di nuova mielina non avviene in maniera adeguata, portando così ad un costante deterioramento della funzione neurologica. Speranze terapeutiche concrete possono derivare dall'identificazione di nuovi bersagli molecolari per stimolare la rimielinizzazione, un processo sostenuto dalla proliferazione dei precursori degli OL e dal loro differenziamento. È ormai noto che un'ampia gamma di molecole pro-infiammatorie, chiamate citochine e chemochine, sono espresse e aumentate negli OL in risposta all'infiammazione e alla demielinizzazione. Inoltre, numerose evidenze dimostrano che gli OL esprimono diversi recettori per molecole con funzione immunomodulante, che consentono loro di percepire l'infiammazione e di reagire. Tuttavia, resta ancora da esplorare il ruolo della risposta immunitaria degli OL durante la demielinizzazione. Su queste basi, il presente progetto si è focalizzato su STING e TLR3, due recettori che riconoscono gli acidi nucleici citoplasmatici e promuovono l'autoimmunità e l'autoinfiammazione. Sebbene siano stati condotti diversi studi per chiarire la loro funzione nelle cellule immunitarie, come la microglia, la loro espressione e ruolo negli OL rimangono poco chiari.

### RISULTATI

I nostri risultati hanno mostrato per la prima volta che entrambi i recettori sono espressi nel cervello adulto sia dai

precursori degli OL proliferanti sia dalle cellule che stanno differenziando. Inoltre, un'aumentata espressione di entrambi i recettori, e di due chemochine ad essi correlati (Ccl2 e Cxcl10), è stata osservata negli OL in fase di differenziamento ma non nei precursori proliferanti nel modello di demielinizzazione focale indotto dalla lisolecitina. Questi dati suggeriscono una diversa risposta immunitaria delle due popolazioni in seguito alla demielinizzazione.

Al fine di caratterizzare l'espressione e la funzione di STING negli OL, abbiamo eseguito esperimenti in vitro in colture primarie di OL. Abbiamo osservato che i livelli di Sting sono significativamente più bassi negli OL mantenuti in condizioni di differenziamento rispetto alle cellule mantenute in condizioni di proliferazione. Inoltre, i nostri dati preliminari hanno mostrato che le cellule poste in condizioni di differenziamento e stimulate con DMXAA, un ligando sintetico che attiva STING, presentano un'aumentata espressione dei geni della mielina. I nostri risultati suggeriscono quindi che la stimolazione del recettore ha un effetto positivo sul differenziamento degli OL.

Per quanto riguarda TLR3, i risultati in vitro su OL trattati durante il differenziamento con Poly (I:C), una molecola in grado di attivare il recettore, hanno mostrato un maggior aumento di Ccl2 e Cxcl10 rispetto alle cellule trattate durante la proliferazione, e hanno rivelato difetti di maturazione da parte di queste cellule. Inoltre, abbiamo dimostrato che gli OL trattati con Poly (I:C) durante la proliferazione o il differenziamento modulano in modo differente l'attivazione della microglia. Infatti, abbiamo evidenziato un'aumentata espressione di marcatori pro-infiammatori nella microglia posta in coltura con il mezzo condizionato di OL trattati con Poly (I:C) in fase di differenziamento. Al contrario, il terreno condizionato da OL proliferanti stimo-

lati con Poly (I:C) aumenta nella microglia l'espressione di marcatori noti per indirizzare la microglia verso un fenotipo anti-infiammatorio (Ilr1n, Socs3, Tgf $\beta$  e Bdnf). Infine, a ulteriore conferma del fatto che la diversa risposta delle due popolazioni di OL alla stimolazione di TLR3 si traduce in un diverso effetto sul fenotipo della microglia, sia l'area che il perimetro delle cellule microgliali sono risultati maggiormente influenzati dal mezzo condizionato di OL in fase di differenziamento e trattati con Poly (I:C).

### CONCLUSIONI

Le attuali conoscenze sull'insorgenza e sulla progressione della SM derivano da ricerche incentrate sulla sua natura

autoimmune e sul ruolo svolto dalle cellule immunitarie infiltrate dalla periferia e dalla microglia. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che anche gli OL abbiano un ruolo immunomodulatore. Inoltre, un dato importante emerso dai nostri risultati è che lo stato di maturazione degli OL stimolati da Poly (I:C) influenza la comunicazione tra OL e microglia. La piena comprensione della funzione immuno-infiammatoria degli OL nel sito di lesione della mielina potrebbe fornire nuovi bersagli terapeutici per controllare la neuroinfiammazione e promuovere la riparazione della mielina.

## Differential response of oligodendrocyte progenitor cells and immature oligodendrocytes to demyelination: implications for novel strategies to improve remyelination

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is characterized by damage of myelin forming oligodendrocytes (OLs) and destruction of myelin sheath. Demyelination leaves denuded axons without trophic and metabolic support and thus more prone to degeneration. Current immunosuppressive and immunomodulatory drugs are able to attenuate myelin degeneration but are unfortunately not helpful in the "progressive" form of MS, where the generation of new myelin does not occur effectively, resulting in a steady deterioration in neurological function. Concrete therapeutic hopes may come from identifying new molecular targets to stimulate remyelination, thereby restoring the ability of neurons to communicate with each other. Two processes, the proliferation of oligodendrocyte progenitor cells and the differentiation of immature oligodendrocytes are important for remyelination. A wide range of pro-inflammatory molecules, called cytokines and chemokines, are expressed and upregulated in OLs in response to inflammation and demyelination, and numerous reports show that OLs express several receptors for immune related molecules, which enable them to sense inflammation and to react. However, the role of OL immune response during demyelination remains to be explored. On this basis, the present project focused on STING and TLR3, two receptors that recognize cytoplasmic nucleic acids and promote autoimmunity and autoinflammation. Although several studies have been conducted to elucidate their function in immune cells, such as microglia, their expression and role in oligodendrocytes remain unclear.

### RESULTS

Our results showed, for the first time, that both receptors are expressed in adult brain by differentiating and proliferating OLs. Interestingly, an increased expression of both receptors and two related chemokines involved in the chemoattraction of immune cells from the periphery (Ccl2 and Cxcl10) have been observed in differentiating cells but not in proliferating precursors in the focal demyelination model induced by lysolecithin. These data suggest a different immune response of the two populations following demyelination.

In order to elucidate the expression and function of STING in OLs, we performed in vitro experiments in primary oligodendroglial cultures. We observed that STING levels are significantly lower in OLs maintained under differentiating conditions than in cells maintained under proliferating conditions. Our preliminary data also showed that cells placed in differentiating conditions and stimulated with DMXAA, a synthetic ligand that activates the Sting signaling cascade, exhibit increased expression of myelin Plp and Mog genes. Thus, our results revealed that OLs express the Sting receptor and that its stimulation promotes cell differentiation.

Regarding TLR3 signaling, in vitro results on OLs treated with the TLR3 agonist Poly (I:C) during differentiation showed a higher upregulation of CCl2 and Cxcl10 compared to cells treated during proliferation. As a result of this, defects in reaching the more mature phenotype have been observed in differentiating cells. Of note, we also showed that OLs treated with Poly (I:C) during proliferation or

differentiation differentially modulate the activation of microglia. Indeed, we detected an increased expression of pro-inflammatory markers in microglia cultured with conditioned medium from differentiating cells treated with Poly (I:C). On the contrary, conditioned medium from Poly (I:C)-stimulated proliferating OLs increases the expression of markers known to drive activated microglia toward an anti-inflammatory phenotype (Ilr1n, Socs3, Tgf $\beta$  and Bdnf) in primary microglial cultures. Finally, further confirming that the different response of the two populations of OLs to TLR3 stimulation results in a different effect on microglia phenotype, both area and perimeter of microglial cells are more affected by conditioned medium from differentiating OPCs treated with Poly (I:C) compared to proliferating OPCs treated with TLR3 agonist.

## CONCLUSIONS

The current understanding of MS comes from research focused on the prominent role played by autoimmunity and inflammation mediated by infiltrating immune cells from the periphery and by the resident microglia. Overall, our data suggest that also OLs have an immunomodulatory role. A major finding from our results is the demonstration that the maturation state of TLR3-stimulated OLs influences OLs-to microglia communication. A full understanding of the immune-inflammatory function of OLs at the site of myelin injury could provide novel therapeutic targets to control neuroinflammation and promote myelin repair.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Boccazzi M, Van Steenwinckel J, Schang A-L, Faivre V, Le Charpentier T, Bokobza C, Csaba Z, Verderio C, Fumagalli M, Mani S, Gressens P. The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. *Cell Death Dis* 2021; 12:166.
- Raffaele S, Boccazzi M, Fumagalli M. Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells* 2021; 10:565.
- Marangon D, Caporale N, Boccazzi M, Abbracchio MP, Testa G, Lecca D. Novel in Vitro Experimental Approaches to Study Myelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Front. Cell. Neurosci.* 2021; 15, 417.
- Boccazzi M, Raffaele S, Fumagalli M. Not only myelination: the immune-inflammatory functions of oligodendrocytes. *Neural Regen. Res.* 2022, 17, 2661
- Boccazzi M, Van Steenwinckel J, Schang A-L, Faivre V, Csaba Z, Verderio C, Fumagalli M, Mani S, Gressens P. The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. MyDEV2020 meeting, 20th of November 2020 (telematic)
- Boccazzi M, Van Steenwinckel J, Schang A-L, Faivre V, Csaba Z, Verderio C, Fumagalli M, Mani S, Gressens P. The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. *BraYn - 3rd Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists*, 25th-26th November 2020 (telematic)
- Boccazzi M, Van Steenwinckel J, Schang A-L, Faivre V, Csaba Z, Verderio C, Fumagalli M, Mani S, Gressens P. The immune-inflammatory response of oligodendrocytes during neuroinflammation and white matter injury: the role of TLR3 activation 19th National congress of the Italian Society for Neuroscience, 9th-12th September 2021 (telematic)

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 69.500 €**  
Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years and the amount of € 69,500

# I recettori A2B per l'adenosina modulano correnti al K<sup>+</sup> necessarie per la differenziazione oligodendrocitaria: possibile coinvolgimento della via Sfingosina-1-fosfato



**Elisabetta Coppi**

*Dipartimento Neurofarba, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia*

MENTORE/MENTOR  
**Anna Maria Pugliese**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Numerosi studi dimostrano che il fattore limitante nei processi di rimielinizzazione in seguito ad un danno è la differenziazione dei precursori degli oligodendrociti (OPC), le cellule addette alla produzione di mielina, in oligodendrociti maturi (OL) ed in grado di rimielinizzare gli assoni neuronali danneggiati. Infatti li OPC vengono reclutati efficacemente all'interno delle lesioni da SM, ma la loro maturazione ad oligodendrociti è resa sempre più difficile, specialmente col progredire della malattia, a causa dell'ambiente neuroinfiammatorio.

Tra i fattori che influenzano la differenziazione degli OPC ci sono: i canali al potassio voltaggio-dipendenti, il neuro-modulatore adenosina, rilasciato dalle cellule in seguito ad eventi infiammatori, e la sfingosina 1-fosfato (S1P), un metabolita ubiquitario modulato, fra l'altro, dall'unico farmaco orale già in terapia per la SM, fingolimod. Un'interazione fra i recettori A2B per adenosina ed il pathway di S1P è stato già dimostrato in altri tipi cellulari, ma non in oligodendrociti.

Il presente progetto era mirato a dimostrare una possibile interazione fra i recettori A2B e S1P in oligodendrociti immaturi (OPC) o maturi (OL) per elaborare nuove strategie farmacologiche in grado di agire in maniera sinergica su entrambi i target e potenziare maggiormente i meccanismi di rimielinizzazione in seguito a danno da SM.

I nostri obiettivi erano:

1. dimostrare il ruolo dei recettori A2B nella modulazione delle correnti potassiche, che regolano la differenziazione di queste cellule, e descrivere i meccanismi cellulari coinvolti
2. determinare la possibile azione modulatrice di S1P nell'effetto dei recettori A2B sulle correnti potassiche

3. esplorare il potenziale mielinizzante dei ligandi per i recettori A2B di adenosina, applicati da soli o in concomitanza con S1P o suoi analoghi, in un modello di mielinizzazione in vitro che consiste nella preparazione di co-culture di neuroni dei gangli delle corna dorsali (dorsal root ganglia: DRG) e di OPC (entrambi i tipi cellulari venivano isolati da ratto).

## RISULTATI

Durante il primo anno del progetto, abbiamo portato a termine i primi due obiettivi. Abbiamo infatti dimostrato come l'agonista dei recettori A2B per l'adenosina, BAY60-6583 (BAY) inibisce le correnti al potassio voltaggio-dipendenti necessarie per la differenziazione di OPC ad OL. Questo effetto è prevenuto sia da bloccanti selettivi dei canali potassici, sia da molecole che interferiscono con la formazione di AMP ciclico intracellulare, comprovando quindi il coinvolgimento di questo metabolita nell'effetto.

Abbiamo inoltre dimostrato che il pathway di S1P è in grado di interagire direttamente con la segnalazione adenosinergica esercitata dai recettori A2B poiché fingolimod fosforilato (FTY720P), applicato alle culture di OPC prima dell'agonista A2B, è in grado di modulare in maniera differenziale l'effetto di BAY in base alle concentrazioni somministrate: alte (nell'ordine micromolare) o basse (nell'ordine nanomolare). Infine, durante il secondo anno, abbiamo messo a punto il modello di co-culture OPC-DRG per testare i suddetti farmaci in un modello in vitro di mielinizzazione. I risultati da noi ottenuti dimostrano che l'agonista dei recettori A2B per adenosina, BAY, aumenta la mielinizzazione lungo gli assoni neuronali senza però modificare la deposizione di mielina nella co-cultura. L'effetto bloccato dall'antagonista degli stessi recettori, PSB603.

## CONCLUSIONI

Il presente progetto è stato portato a termine e ha permesso di dimostrare che i recettori A2B per l'adenosina sono dei nuovi possibili target per stimolare la rimielinizzazione nella SM e che la loro azione è regolata, fra l'altro,

da composti sfingolipidici come S1P o il suo analogo, fingolimod-fosforilato. I nostri dati suggeriscono il possibile uso di ligandi A2B come coadiuvanti nella terapia della SM per migliorare la riparazione del danno.

# A2B adenosine receptors modulate K<sup>+</sup> currents necessary to oligodendroglial differentiation and myelin deposition: involvement of Sphingosine-1-phosphate signaling pathway

## INTRODUCTION AND AIMS

Evidences indicate that oligodendrocyte progenitor cell (OPC) differentiation into mature oligodendrocytes (OLs) is the rate-limiting step in remyelinating processes after a demyelinating insult. Indeed, OPCs are efficiently recruited within MS lesions but their maturation in myelinating OLs is hampered possibly by unfavourable environmental cues. Among factors able to influence oligodendrogenesis are: voltage-dependent potassium currents; adenosine, an important neuromodulator released in the brain during inflammation and sphingosine 1-phosphate (S1P), a ubiquitous metabolite whose signalling pathway is targeted by the MS drug fingolimod. An interaction between adenosine A2B receptors and S1P signalling has already been demonstrated in other cell types, but never in oligodendroglial cells. Our research was aimed at exploring possible interactions between A2B receptor and S1P in OPCs or OLs in order to find new pharmacological tools able to synergistically act on both targets in order to potentiate innate brain repairing/remodelling mechanisms in MS therapy.

Our research project was aimed to:

1. to corroborate the involvement of A2B receptors in the modulation of K<sup>+</sup> currents necessary for OPC maturation and the molecular mechanisms of this effect
2. to investigate whether S1P signalling is involved in the A2B receptor-mediated effect on POTASSIUM currents
3. to explore the re-myelinating potential of A2B receptor ligands, alone or in combination with S1P-related molecules, in dorsal root ganglion (DRG) neurons – OPCs co-cultures.

## RESULTS

During the first year, we fulfilled tasks 1 and 2 of the project, e.g.:

1. We demonstrated that the A2BR agonist, BAY60-6583, inhibited potassium currents in cultured OPCs

and this effect was sensitive to potassium channel blockers and to substances interfering with intracellular cAMP levels, indicating the involvement of intracellular cAMP in this effect.

2. We demonstrated the involvement of S1P-related signalling in the A2BR-mediated modulation of potassium currents in OPCs by proving that phosphorylated fingolimod (FTY720P), added to OPCs before the A2BR agonist BAY60-6583 (BAY), was able to inhibit or enhance BAY-mediated effect on POTASSIUM currents, depending on the concentration of FTY720P. During the second year of the project, we accomplished task 3:
3. We set up the experimental protocol of OPC-DRG neurons co-cultures, an extensively used in vitro protocol to measure axonal remyelination index in the absence/presence of a variety of compounds. By the present research, we demonstrated, for the first time, that the A2BR agonist BAY increased myelin deposition along neuronal axons without affecting total myelin staining in the co-culture, an effect prevented by the selective A2BR antagonist PSB-603 (10 nM).

## CONCLUSIONS

In conclusion, we fulfilled all the project's tasks by demonstrating that A2BRs are innovative "druggable" targets whose action is finely modulated by S1P-related compounds such as fingolimod. In particular, the fact that A2BRs potentiate axonal myelination, together with evidence that Fingolimod-phosphate modulates their effect, suggest that A2BR agonists might be developed as combined treatment compounds to fingolimod to boost remyelination in MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/Publications

- Coppi E, Cherchi F, Fusco I, Dettori I, Gaviano L, Magni G, Catarzi D, Colotta V, Varano F, Rossi F, Bernacchioni C, Donati C, Bruni P, Pedata F, Cencetti F and Pugliese AM. Adenosine A2B receptors inhibit K<sup>+</sup> currents and cell differentiation in cultured oligodendrocyte precursor cells and modulate sphingosine-1-phosphate signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2020 Jul 177:113956; doi: 10.1016/j.bcp.2020.113956
- Coppi E, Dettori I, Cherchi F, Bulli I, Venturini M, Lana D, Giovannini MG, Pedata F, Pugliese AM. A2B adenosine receptors: when outsiders may become an attractive target to treat brain ischemia or demyelination. *Int J Mol Sci* 2020 Dec 18;21(24):9697; doi: 10.3390/ijms21249697
- Cherchi F, Pugliese AM, Coppi E. Oligodendrocyte precursor cell maturation: role of adenosine receptors. *Neural Regen Res* 2021 Sep;16(9):1686-1692; doi: 10.4103/1673-5374.306058
- Coppi E, Buonvicino D, Ranieri G, Cherchi F, Venturini M, Pugliese AM and Chiarugi A. Dexpropipexole enhances K<sup>+</sup> currents and inhibits cell excitability in the rat hippocampus in vitro. *Mol Neurobiol* 2021 Jun 58(6):2955-2962; doi: 10.1007/s12035-021-02300-5
- Coppi E, Dettori I, Cherchi F, Bulli I, Venturini M, Pedata F, Pugliese AM. New insight into the role of adenosine in demyelination, stroke and neuropathic pain. *Front Pharmacol* 2021 Jan 29;11:625662, doi: 10.3389/fphar.2020.625662. eCollection 2020
- Coppi E, Cencetti F, Cherchi F, Venturini M, Donati C, Bruni P, Pedata F and Pugliese AM. A2B adenosine receptors and sphingosine 1-phosphate signalling cross-talk in oligodendroglialogenesis. *Front Neurosci* 2021 May 26;15:677988. doi: 10.3389/fnins.2021.677988. eCollection 2021
- Cherchi F, Bulli I, Venturini M, Pugliese AM and Coppi E. Ion channels as new attractive targets to improve re-myelination processes in the brain. *Int J Mol Sci* 2021 Jul 6;22(14):7277. doi: 10.3390/ijms22147277
- Coppi E, Cherchi F, Lucarini E, Ghelardini C, Pedata F, Jacobson KA, Di Cesare Mannelli L, Pugliese AM, Salvemini D. Uncovering the mechanisms of adenosine receptor-mediated pain control: focus on the A3 receptor subtype. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 26;22(15):7952. doi: 10.3390/ijms22157952
- Borgonetti V, Coppi E, Galeotti N. Targeting the RNA-Binding protein HuR as potential therapeutic approach for neurological disorders: focus on Amyo-trophic Lateral Sclerosis (ALS), Spinal Muscle Atrophy (SMA) and Multiple Sclerosis (MS). *Int J Mol Sci* 2021 Sep 27;22(19):10394; doi: 10.3390/ijms221910394.
- Coppi E, Cherchi F, Venturini M, Lucarini E, Corradetti R, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Pedata F and Pugliese AM. Therapeutic potential of highly selective A3 adenosine receptor ligands in the central and peripheral nervous system. *Molecules* 2022 Mar 15;27(6):1890. doi: 10.3390/molecules27061890
- Coppi E & Gibb AJ. Selective block of adenosine A2A receptors prevents ischemic-like effects induced by oxygen and glucose deprivation in rat medium spiny neurons. *Br J Pharmacol*. 2022 Oct;179(20):4844-4856. doi: 10.1111/bph.15922

### Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations

- SINS 19° National Congress SOCIETA' ITALIANA NEUROSCIENZE (on-line) 9-11 Sept 2021
- SIF 40° National Congress SOCIETA' ITALIANA DI FARMACOLOGIA (on-line) 9-13 March 2021
- European FENS Forum (Paris): 9-13 July 2022
- SfN World Congress of the Society for Neuroscience (San Diego, CA, US): 12-16 Nov 2022
- 11° Meeting of the Brazilian Purine Club (Búzios, Rio de Janeiro) 13-16 Sept 2022

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 219 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 52.000 €**  
Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years and the amount of € 52,000

# Applicazione della stimolazione di corrente diretta transcranica per prevenire il danno al nervo ottico e promuovere la remielinizzazione in modello di topo di encefalomielite autoimmune sperimentale



## Silvia Marenga

Unità di Neurofisiologia Sperimentale, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE) - IRCCS-Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

MENTORE/MENTOR  
**Letizia Leocani**

### PREMESSE E OBIETTIVI

La stimolazione transcranica a corrente continua (tDCS) sta diventando uno strumento promettente in ricerca. Il suo effetto sulla neuroplasticità mostra la capacità della tDCS di modulare le funzioni corticali nel cervello. Infatti non induce attività nelle reti neuronali a riposo ma modula l'attività neuronale spontanea attraverso de- o iperpolarizzazione dei potenziali transmembrana (stimolazione catodica e anodica). Come già dimostrato, la tDCS anodica porta ad un aumento dell'eccitabilità neuronale della corteccia cerebrale, mentre la tDCS catodica, dove la direzione della corrente è invertita, induce una diminuzione dell'eccitabilità. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la tDCS non solo influenza la trasmissione elettrica, ma anche le cellule gliali e l'equilibrio tra neurotrasmissione eccitatoria e inibitoria. Il meccanismo molecolare della tDCS rimane poco chiaro, ma queste caratteristiche possono essere coinvolte nella modulazione dell'infiammazione e degenerazione nella sclerosi multipla (SM). Nella SM la demielinizzazione e perdita assonale seguono l'infiammazione e il sistema visivo è vulnerabile agli attacchi immunologici. Circa il 20% dei pazienti con SM ha una presentazione clinica con esordio tramite neurite ottica (ON). Considerando che è possibile studiare il danno della SM in preclinica, è stata investigata l'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA) nel topo.

La prima parte del progetto era focalizzata ad investigare l'effetto della tDCS per prevenire il danno visivo nella fase iniziale della malattia ESA. Nella seconda parte, la tDCS è stata applicata nella fase acuta di ESA per modulare la risposta immunitaria acuta e il recupero del danno funzionale e strutturale visivo. Per raggiungere questi obiettivi sono stati coinvolti diverse tecniche non invasive come la

registrazione di potenziali evocati visivi (PEV), l'elettroretinogramma fotopico (pERG), la tomografia a coerenza ottica (OCT) e in fine l'istologia per validare i risultati *in vivo*.

### RISULTATI

I risultati della tDCS applicata nella prima fase di ESA hanno mostrato un recupero dei PEV nei ESA-Catodici rispetto agli occhi di ESA-Controllo e ESA-Anodici. Inoltre, nel nervo ottico è stata rivelata una significativa riduzione di microglia/macrofagi e una minore perdita assonale in ESA-Catodici rispetto a ESA-Controllo e ESA-Anodici, mentre la percentuale di demielinizzazione con colorazione Luxol-fast blue era paragonabile. Quindi focalizzando sulla mielina sono stati investigati i domini paranodali. I risultati hanno rivelando un numero significativamente più elevato di domini paranodali completi nei topi ESA-Catodici, rispetto ai gruppi ESA-Controllo e ESA-Anodici. Questi risultati sono stati riflessi dalla correlazione negativa tra il numero di domini paranodali completi e l'aumento della latenza PEV. Infine, la tDCS catodica è stata associata a un numero inferiore di paranodi singoli rispetto a ESA-Controllo. Passando alla seconda fase di malattia, ESA acuta, entrambe le stimolazioni attive hanno ripristinato la funzionalità del nervo ottico, mentre solo la tDCS catodica ha parzialmente protetto dall'ispessimento retinico. Questi risultati sono stati confermati dalla colorazione della mielina e del neurofilamento che hanno mostrato il recupero strutturale del nervo ottico sia di ESA-Anodici che -Catodici ma non in ESA-Controllo. È stata inoltre dimostrata una densità microglia/macrofagi significativamente ridotta in ESA-Catodici rispetto a ESA-Controllo e ESA-Anodici. Per quanto riguarda il sistema motorio, la tDCS catodica ha ridotto la disabilità mo-

toria e la gravità della malattia. Immunofluorescenza sul tessuto ha mostrato una significativa perdita di mielina e assoni in EAE-Controllo e EAE-Anodici e non in ESA-Catodici. Mentre la densità delle cellule microglia/macrofagi era significativamente più alta in tutti i gruppi ESA rispetto ai controlli sani.

## CONCLUSIONI

Questi risultati suggeriscono che la tDCS catodica esercita un effetto antinfiammatorio nella fase preventiva di ESA.

Questo trattamento potrebbe essere traslato in pazienti con SM che devono interrompere i farmaci e devono prevenire futuri attacchi. Per quanto riguarda il trattamento in fase acuta della malattia ESA, entrambe le stimolazioni attive hanno recuperato completamente la disfunzione visiva mentre solo la catodica ha ridotto la disabilità motoria. Tuttavia, la tDCS anodica ha mostrato effetti benefici nella seconda parte del trattamento. Pertanto, questa seconda applicazione del trattamento potrebbe coinvolgere pazienti SM dopo neurite ottica e in progressione di malattia.

# Transcranial direct current stimulation applied to prevent optic nerve damage and to promote remyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model

## INTRODUCTION AND AIMS

Transcranial direct current stimulation (tDCS) has become a promising tool in neuroplasticity research, in clinical and preclinical field, showing the possibility to modulate cortical functions in the brain. TDCS does not induce activity in resting neuronal networks but modulates spontaneous neuronal activity and the primary effect of tDCS is a neuronal de- or hyperpolarization of transmembrane potentials (cathodal and anodal stimulation). As already demonstrated, anodal tDCS leads to an increase in neuronal excitability of the cerebral cortex underlying the active electrode. Whereas cathodal tDCS, where the current direction is reversed, induces an excitability decrease. Moreover, evidence showed that tDCS not only influence electrical transmission but also influences glial cells and the balance between excitatory and inhibitory neurotransmission, glutamate and GABA respectively.

Unfortunately, the precise mechanism underlining tDCS effects remains unclear but its features can be involved to modulate the immune response and degenerative damage in Multiple Sclerosis (MS). Indeed, MS is a neurodegenerative disease of the central nervous system in which demyelination and axonal loss followed inflammation. The visual system is vulnerable to immunologic attack particularly in the early stage of the disease. About 20% of MS patients have a clinical presentation that starts with optic neuritis (ON) leading to myelin and axonal loss in optic nerve and retina. Considering that is possible to mimic MS damage in preclinical mouse model, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) was involved. It is already demonstrated that this model showed immune response, excitatory/inhibitory system dysregulation, cerebral cortex alteration as well as visual degeneration. In particular,

the first project aim was to applied multi-session tDCS to prevent the visual damage in the early EAE disease phase. Second aim was to applied tDCS in acute EAE phase to modulate the acute immune response and recovery visual functional and structural damage. To address these aims several non-invasive methods were involved as visual evoked potentials (VEPs), phoropic electroretinogram (pERGs), optic coherence tomography (OCT). At the end, immunohistochemistry was involved to validate *in vivo* results.

## RESULTS

In early EAE phase, results showed that mice undergoing cathodal stimulation had significantly less delayed compared with eyes from EAE-Sham and EAE-Anodal.

Optic nerve immunohistochemistry revealed a significantly lower cell density of microglia/macrophages, and less axonal loss in EAE-Cathodal vs EAE-Sham and EAE-Anodal, while the percent demyelination with Luxol-fast blue staining was comparable among EAE groups. Considering the latter result, immunofluorescence paranodal staining was performed, revealing a significantly higher number of complete paranode domains in EAE-Cathodal, closer to healthy mice, compared with EAE-Sham and EAE-Anodal groups. These results were reflected by the negative correlation between the number of complete paranode domains and VEP latency increase with respect to pre-immunization. Finally, cathodal tDCS was associated with a lower number, closer to healthy, of single paranodes in contrast to EAE-Sham. Moving on the acute EAE phase, both active stimulations restored the optic nerve functionality, while only cathodal tDCS partially protected from retinal structural damage. Interesting results were found

on the clinical score and disease incidence because cathodal tDCS decreased the motor disability and the disease severity. In vivo results were confirmed by myelin and neurofilament staining that showed recovery in optic nerve of both EAE-Anodal and EAE-Cathodal while in EAE-Sham myelin was significantly decreased compared to Healthy. About Iba 1 staining, cells density was significantly reduced in EAE-Cathodal compared to EAE-Sham and EAE-Anodal, which presented a significant infiltration compared to Healthy. Moving to coronal spinal cord sections, myelin and neurofilament stainings showed significant myelin loss in EAE-Sham and EAE-Anodal compared to Healthy. While density of microglia/macrophage cells was significantly higher in all EAE groups compared to Healthy.

## CONCLUSIONS

These results suggest that cathodal tDCS exert an anti-inflammatory effect in the preventive EAE phase. This treatment could be translated to MS patients that need to stop drugs and need to prevent future attacks. About treatment in acute EAE phase, both active tDCS recovered completely the visual dysfunction and cathodal tDCS reduced motor disability. However, anodal tDCS showed beneficial effects in the second part of treatment. Thus, this second application of the treatment could be involved patients after optic neuritis attack and disease progression.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### *Pubblicazioni/Publications*

- Marenga S, Huang SC, Rossi E, Castoldi V, Comi G, Leocani L. Transcranial direct current stimulation as a preventive treatment in multiple sclerosis? Preclinical evidence. *Exp Neurol.* 2022 Nov;357:114201. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114201

### *Comunicazioni a Congressi/Congress Presentations*

- Marenga S, Huang SC, Castoldi V, Rossi E, Comi G, Leocani L. TDCS to prevent optic nerve damage and to promote remyelination in EAE mouse model. EPoster and Winner of Young Investigator Award at 29th European Charcot Foundation Congress, November 2021. EPoster at 37th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), 2021

- Marenga S, Huang SC, Castoldi V, Rossi E, Comi G, Leocani L. Transcranial direct current stimulation applied in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis mouse model. Poster, Winner of Young Investigator Award at 30th European Charcot Foundation Congress, Baveno 17-19 November 2022. Traditional Poster at 38th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Amsterdam 26-20 October 2022/ 30th European Charcot Foundation Congress

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2019 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 68.800 €**  
Research Fellowship funded by FISM Grant 2019 for the period of 2 years and the amount of € 68,000

# Legame di osteopontina al suo nuovo recettore ICOSL: caratterizzazione funzionale di tale interazione nell'EAE



## Giuseppe Cappellano

Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italia

COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Davide Raineri, Hugo Abreu, Elena Canciani, Nausicaa Clemente, Annalisa Chiocchetti**

### PREMESSE E OBIETTIVI

Varie evidenze scientifiche suggeriscono un ruolo patogenetico per osteopontina (OPN) nella sclerosi multipla (SM). OPN è normalmente assente nel cervello sano, ma è fortemente aumentata nelle placche demielinizzanti di pazienti con SM o topi con encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), che rappresenta il modello animale della SM. OPN favorisce il reclutamento delle cellule infiammatorie nel sistema nervoso centrale (SNC) attraverso il suo legame con i suoi recettori cellulari noti (integrine e CD44). Abbiamo dimostrato, in una ricerca precedente, che OPN ha un nuovo recettore di membrana che si chiama ICOS ligando (ICOSL). Prima della nostra scoperta, si pensava che ICOSL legasse esclusivamente la molecola ICOS espressa dai globuli bianchi. Il legame di ICOS con ICOSL rappresenta il segnale di attivazione della risposta immunitaria. Il fatto che esista un altro recettore per OPN apre uno nuovo possibile scenario in cui OPN può modulare la funzione di diverse cellule nel SNC che esprimono ICOSL e che sono coinvolte nella lesione demielinizzante; questa interazione potrebbe essere a sua volta modulata dalla presenza di ICOS. L'obiettivo principale di questo progetto pilota è quello di studiare il trio molecolare (ICOS/ICOSL/OPN) nei topi con ESA in cui mancano, uno alla volta, i singoli componenti del trio (chiamati topi deficienti), a confronto con il gruppo di topi controllo in cui tutte le molecole sono presenti. Questo progetto pilota si avvale dell'utilizzo di una tecnologia all'avanguardia ad immagini che permette di mappare quali tipi cellulari presenti nella lesione del SNC sono modulati quando ICOSL lega ICOS o quando lega OPN e concorrono nello sviluppo dell'ESA.

### RISULTATI

Grazie al finanziamento ottenuto, abbiamo dimostrato per la prima volta che, in assenza di ICOSL, i topi sviluppano una ESA più grave rispetto ai topi controllo. Dal momento che ICOSL può legare anche ICOS, abbiamo studiato il

decorso clinico dell'ESA anche nei topi deficienti per ICOS: in questi topi, mancando ICOS, ICOSL può legare OPN. Abbiamo dimostrato che anche i topi deficienti per ICOS sviluppano una forma grave di ESA, allo stesso modo dei topi deficienti per ICOSL, rispetto ai topi controllo. I nostri risultati dimostrano che quando ICOS lega ICOSL si ha un effetto protettivo nei confronti dell'ESA. In assenza di ICOS o di ICOSL, i topi si ammalano gravemente allo stesso modo. Tuttavia, abbiamo identificato nei due gruppi di topi delle differenze relative al coinvolgimento di alcune popolazioni cellulari del sistema immunitario che non erano mai state descritte prima nell'ESA. Solo nei topi deficienti per ICOS, ad esempio, abbiamo osservato un aumento di una sottopopolazione di linfociti effettori memoria che potrebbe essere coinvolta nella patogenesi dell'ESA. Ipotizziamo che l'interazione tra OPN e ICOSL possa essere responsabile dell'espansione di queste cellule. Infine, il progetto pilota aveva come obiettivo anche quello di mappare, a livello delle lesioni del SNC, quali cellule del sistema immunitario sono modulate dall'interazione ICOS/ICOSL e quali dall'interazione ICOSL/OPN. A tale scopo, abbiamo utilizzato la tecnologia Hyperion, che è stata sviluppata recentemente e mai applicata allo studio dell'EAS. Ciò ha richiesto un tempo maggiore per la messa a punto del protocollo sperimentale e le analisi sono in corso d'opera.

### CONCLUSIONI

L'impiego di topi deficienti per ICOSL ci ha permesso di delineare il ruolo dell'interazione ICOS-ICOSL nel modulare il decorso clinico dell'ESA e la risposta immunitaria. Il lavoro futuro si focalizzerà sullo studio di come l'interazione OPN-ICOSL possa influenzare le funzioni della sottopopolazione di linfociti memoria nell'ESA. Poiché queste cellule conferiscono una protezione immunitaria, esse possono rappresentare un nuovo bersaglio per i farmaci attuali o di recente sviluppo nella SM.

# Binding of osteopontin to its newly identified receptor ICOSL: exploring their Relevance and Activity IN EAE (BRAIN-EAE)

## INTRODUCTION AND AIMS

Several scientific evidence suggest a pathogenetic role for osteopontin (OPN) in multiple sclerosis (MS). OPN is normally absent in healthy brain but it is increased in demyelinating plaques from MS patients or mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS. OPN favors the recruitment of inflammatory cells in the central nervous system (CNS) by binding to its known receptors (integrins and CD44). We have recently shown that OPN has a novel membrane receptor, namely ICOS ligand (ICOSL). Prior to our discovery, ICOSL was thought to exclusively bind the ICOS molecule expressed by white blood cells. The binding of ICOS with ICOSL represents the activation signal of the immune response. Having found another OPN receptor opens a new possible scenario in which OPN may modulate the function of several ICOSL-expressing cells belonging to the CNS, that are involved in demyelinating lesions; this interaction could in turn be impacted by the presence of ICOS. The main objective of this pilot project is to study the molecular trio (ICOS/ICOSL/OPN) in mice with EAE lacking individual components of the trio (called deficient mice) and comparing with the control group, in which all the molecules are present. This project takes advantage of the use of a cutting-edge imaging technology that allows to investigate which cell types present in the CNS lesion are modulated when ICOSL binds ICOS or OPN and contribute to the development of EAE.

## RESULTS

Thanks to the funding obtained, we demonstrated for the first time that in the absence of the ICOSL molecule, mice

develop a more severe EAE than the control group. Since ICOSL can also bind ICOS, we investigated the EAE clinical course also in ICOS-deficient mice: in this case, ICOSL ligand can bind OPN. We found that ICOS-deficient mice, as well as ICOSL-deficient mice, develop a more severe form of EAE compared to control mice. Our results show that when ICOS binds ICOSL there is a protective effect against EAE. Absence of ICOS or ICOSL exacerbates EAE. However, we identified differences among the two groups related to the involvement of immune cells that had never been described in EAE. For example, we observed only in ICOS-deficient mice an increase of a subpopulation of memory effector lymphocytes that may be involved in the pathogenesis of EAE. We hypothesize that the interaction between OPN and ICOSL may be responsible for their expansion. Finally, this pilot project aimed at mapping which cells of the immune system are modulated by the ICOS/ICOSL and ICOSL/OPN interactions in CNS lesions, using the Hyperion technology, which was recently developed and never applied to the study of EAE. Since the setting of the experimental protocol required more time, the analyses are still ongoing.

## CONCLUSIONS

By employing ICOSL-KO mice, we started to define the role of the ICOS-ICOSL pathway in shaping the immune response and guiding the pathogenesis of EAE. Future work will be focused on unraveling the role of OPN and ICOSL in affecting memory T cell subset functions. Since these cells provide immune protection, they can represent a new target for the current or newly developed drugs in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 24-26 maggio 2022*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2020 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 29.800 €**  
Research project funded by FISM Grant 2020 for the period of 1 year and the amount of € 29,800

# Il sistema endocannabinoide come bersaglio per combattere la sclerosi multipla: degradazione della monoacilglicerolo lipasi da parte dei PROTACs



## Carlotta Granchi

*Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Giulia Bononi, Filippo Minutolo, Viviana Nocilla, Giulio Poli, Tiziano Tuccinardi**

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

**Flavio Rizzolio**, *Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi, Università Ca' Foscari, Venezia, Italia*  
**Clara Ballerini, Roberta Amoriello**, *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il sistema endocannabinoide (ECS) comprende i recettori dei cannabinoidi, gli endocannabinoidi 2-arachidonilglicerolo e anandamide, e i loro enzimi di degradazione monoacilglicerolo lipasi (MAGL) e ammididrolasi degli acidi grassi, rispettivamente. È noto che l'ECS è coinvolto nel processo infiammatorio e neurodegenerativo tipico della sclerosi multipla (SM). In particolare, molti studi dimostrano che l'inibizione della MAGL può alleviare i sintomi della SM e rallentare la progressione della malattia. Tuttavia, tutti gli inibitori MAGL studiati a questo scopo sono piccole molecole standard, la cui modalità di azione si basa sulla loro capacità di legare e inibire la proteina bersaglio e questo aspetto ne limita l'efficacia. La novità di questo progetto risiede nello sviluppo di una strategia innovativa per bloccare la MAGL inducendone la degradazione mediante molecole chiamate PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs). I PROTACs rappresentano un nuovo promettente approccio per la scoperta di farmaci per promuovere in modo specifico la degradazione di una proteina bersaglio, abolendone così le vie di segnalazione. Il nostro scopo è stato quello di progettare e sintetizzare da un punto di vista chimico PROTACs in grado di reclutare l'apparato delle proteasi cellulari per degradare la MAGL. La seconda fase del progetto è stata dedicata alla valutazione in vitro dei composti sintetizzati per determinare la loro capacità di degradare la MAGL nelle cellule. La terza e ultima parte del progetto si è concentrata sui saggi in vivo, testando i migliori PROTACs che degradano la MAGL in un modello murino consolidato di SM, l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA).

## RISULTATI

Supportati da studi di modellistica molecolare, abbiamo sintetizzato PROTACs costituiti da tre diversi componenti: una parte legante la proteina bersaglio che consiste in una porzione tipica degli inibitori MAGL precedentemente sviluppati dal nostro gruppo di ricerca; un ligando che recluta l'ubiquitina ligasi E3, al fine di ubiquitinare MAGL per la sua successiva degradazione da parte del proteasoma cellulare, e infine una regione linker che collega queste due entità bioattive. Dopo la sintesi di sette nuovi PROTACs, essi sono stati sottoposti a test enzimatici su MAGL umana per determinare la loro capacità di legare la proteina bersaglio e tutti hanno dimostrato una certa capacità di inibire la MAGL. Sono stati condotti studi in silico su una molecola rappresentativa tra i nuovi PROTACs, rivelando buone proprietà fisico-chimiche (quali lipofilia, solubilità in acqua e capacità di attraversare la barriera emato-encefalica) e nessuna potenziale tossicità acuta. In questa fase del progetto, i PROTACs sono stati valutati in esperimenti cellulari eseguiti su due linee di cellule tumorali (di tumore al colon umano e di carcinoma ovarico sieroso di alto grado) a tempi e concentrazioni diverse per verificare la nostra ipotesi che queste molecole possano legarsi alla MAGL guidandone la degradazione. In particolare, uno dei PROTACs è riuscito a degradare in modo efficiente la MAGL e questo risultato ci ha spinto a valutare questa molecola nel modello animale di ESA. Abbiamo indotto ESA in topi C57Bl/6 mediante immunizzazione attiva con il peptide MOG<sub>35-55</sub> e la molecola è stata somministrata solubilizzata nel veicolo idoneo, alla dose di 5 mg/kg, in 100 µL, mediante una iniezione intrape-

ritoneale, a 10 (insorgenza di ESA) e 15 (fase acuta) giorni post-immunizzazione (d.p.i.). La gravità dell'ESA era più lieve negli animali trattati rispetto agli animali non trattati nella fase acuta, a 14 e 15 d.p.i. In base alla ridotta gravità dell'ESA, l'istopatologia del midollo spinale dei topi trattati ha riportato una minore demielinizzazione e una minore infiltrazione cellulare. Inoltre, i topi trattati hanno mostrato un'astrogliosi più lieve nella materia grigia del midollo spinale e una ridotta perdita neuronale.

## CONCLUSIONI

Abbiamo sviluppato i primi PROTACs mai riportati che hanno come target la MAGL, raggiungendo risultati prometten-

ti nel modello animale ESA (infiammazione e danni limitati al sistema nervoso centrale e un effetto protettivo su astroglia e neuroni). I nostri risultati non solo hanno confermato MAGL come un valido bersaglio terapeutico per i processi patogenetici della SM, ma soprattutto hanno rivelato che i PROTACs potrebbero essere considerati agenti terapeutici potenzialmente sicuri per migliorare la progressione della SM. Questo progetto ha identificato un nuovo potenziale approccio terapeutico per controllare i sintomi e la progressione della malattia della SM.

# Targeting the endocannabinoid system to fight multiple sclerosis: monoacylglycerol lipase degradation by PROTACs

## INTRODUCTION AND AIMS

The endocannabinoid system (ECS) includes the cannabinoid receptors, the endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol and anandamide, and their degrading enzymes monoacylglycerol lipase (MAGL) and fatty acid amide hydrolase, respectively. It is known that ECS is involved in the inflammatory process and neurodegeneration typical of multiple sclerosis (MS). In particular, many studies demonstrate that MAGL inhibition can alleviate the symptoms of MS and slowdown the progression of the disease. Nevertheless, all MAGL inhibitors studied for this purpose are standard small molecules, whose mode of action is based on their ability to bind and inhibit the target protein and this aspect limits their efficacy. The novelty of this project stays in the development of an innovative strategy to block MAGL by inducing its degradation by means of molecules called PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTACs). PROTACs represent a novel promising drug discovery approach to specifically promote degradation of a target protein, thus abolishing its respective signaling pathways. We aimed at designing and chemically synthesizing PROTACs able of recruiting the cellular proteases apparatus to degrade MAGL. The second phase of the project was devoted to the *in vitro* evaluation of the synthesized compounds to determine their ability to degrade MAGL in cells. The third and last part of the project was focused on *in vivo* assays, by testing the best PROTACs degrading MAGL in a well-established mouse model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

## RESULTS

Supported by molecular modeling studies, we synthesized PROTACs made of three different components: a target

protein-binding moiety that consists in a portion typical of MAGL inhibitors previously developed by our research group; a ligand recruiting E3 ubiquitin ligase, in order to ubiquitinate MAGL for its subsequent degradation by the cellular proteasome, and finally a linker region that connects these two bioactive entities. After the synthesis of seven new PROTACs, they were subjected to enzymatic assays on human MAGL to determine their ability to bind the target protein and all of them demonstrated a certain ability to inhibit MAGL. *In silico* studies were performed on a representative molecule among the new PROTACs, revealing good physicochemical properties (such as lipophilicity, aqueous solubility and ability to cross blood-brain barrier) and no potential acute toxicity. At this stage of the project, PROTACs were evaluated in cellular experiments performed on two cancer cell lines (human colon and high-grade serous ovarian cancer cells) at different times and concentrations to verify our hypothesis that these molecules can bind MAGL driving its degradation. In particular, one of the PROTACs was successful in efficiently degrade MAGL and this result prompted us to evaluate this molecule in animal model of EAE. We induced EAE in C57Bl/6 mice by active immunization with MOG<sub>35-55</sub> peptide and the molecule was administered dissolved in the suitable vehicle, at a dosage of 5 mg/kg, in 100  $\mu$ L, by one intraperitoneal injection, at 10 (EAE onset) and 15 (acute phase) days post-immunization (d.p.i.). EAE severity was milder in treated animals compared to untreated animals in the acute phase, at 14 and 15 d.p.i. According to the reduced EAE severity, treated mice spinal cord histopathology reported less demyelination and less cell infiltration. Furthermore, treated mice showed milder astrogliosis in spinal cord gray matter, and reduced neuronal loss.

## CONCLUSIONS

We developed the first ever reported PROTACs targeting MAGL, reaching promising results in EAE animal model (limited CNS inflammation and damage, and a protective effect on astroglia and neurons). Our results not only confirmed MAGL as a valid therapeutic target for MS patho-

genic processes, but importantly revealed that PROTACs could be considered potentially safe therapeutic agents to ameliorate MS progression. This project has identified a new potential therapeutic approach to control symptoms and disease progression of MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Poster presentation

- Poli G, Bononi G, Nocilla V, Minutolo F, Tuccinardi T, Rizzolio F, Ballerini C, Granchi C. *Targeting the endocannabinoid system to fight multiple sclerosis: monoacylglycerol lipase degradation by PROTACs. Annual Scientific Congress Italian MS Society and its Foundation - Rome, May 24-26, 2022.*

### **Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2020 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2020 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

# Progettazione e studi funzionali dell'efficacia terapeutica dei nuovi mimetici di SOCS1 nella sclerosi multipla



## Daniela Marasco

*Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli "Federico II," Napoli, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Sara La Manna, Anna Maria Malfitano, Concetta Di Natale**

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

**Marilisa Leone, Istituto di Biostrutture e Bioimaging (IBB), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli, Italia**

78

## PREMESSE E OBIETTIVI

Per esplorare e stabilire chiaramente le potenzialità dell'inibizione della via JAK-STAT, che è un rilevante target terapeutico in sclerosi multipla (SM), questo progetto è stato incentrato sulla progettazione di nuovi composti che imitano l'azione della proteina SOCS1 quale inibitore naturale della via JAK-STAT. Sulla base di precedenti studi su un mimetico di SOCS1, denominato PS5, in questo studio sono stati progettati nuovi composti mediante procedure di chimica farmaceutica.

## RISULTATI

Le capacità dei nuovi composti progettati di mimare l'attività biologica della proteina SOCS1 sono state valutate in saggi funzionali in vitro quali saggi di legame diretto alla chinasi JAK2, sua partner naturale e successivi studi relazione-struttura. I fattori strutturali e funzionali necessari al meccanismo di riconoscimento di JAK2 di una serie di peptidomimetici cicli recanti mutazioni puntiformi e diverse dimensioni del ciclo sono stati profondamente studiati. Inoltre due nuovi analoghi di KIR-SOCS1 sono stati progettati applicando la strategia CLIPS (Chemical Linkage of Peptides on Scaffolds) ed analizzati. Tutti i composti sono stati analizzati nelle loro preferenze conformazionali mediante spettroscopie di dicroismo circolare e NMR e nella loro capacità di legare JAK2, attraverso il saggio di legame di termoforesi su micro scala (MST). Prima di valutare la loro attività cellulare, tutti i mimetici di SOCS1 sono stati analizzati nella loro stabilità alle proteasi sieriche e sono stati incapsulati in nanoparticelle basate su acido poli(lattico-co-glicolico) PLGA.

La maggior parte degli obiettivi prospettati sono stati raggiunti soprattutto quelli legati al design, sintesi chimica e saggi in vitro. Più complessa invece è stata la fase di selezione ed acquisto dei reagenti per saggi cellulari che sono stati rallentati anche dalle restrizioni di presenza nei laboratori di ricerca della Federico II a causa del COVID 19. Per questi motivi i saggi cellulari effettuati sui nuovi mimetici selezionati sono promettenti ma ancora in corso.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo progetto sono cruciali per una traslazione diretta di peptidomimetici a specifici inibitori di JAK2 che risultano molto promettenti come mimetici di SOCS1 poichè mostrano un meccanismo molecolare selettivo associato all'insorgenza dell'infiammazione e che possono avere future applicazioni terapeutiche nella SM (Proximity to cure). In questo progetto è stata inoltre confermata l'efficacia.

# Design and functional investigations of the therapeutic efficacy of novel SOCS1 mimetics in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

To explore and clearly establish the potentialities of the inhibition of JAK-STAT pathway, a relevant target in multiple sclerosis (MS), this project was focused on the design of new compounds mimicking SOCS1 protein action as natural inhibitor of cytokine JAK-STAT signaling. On the basis of previous studies on a SOCS1 mimetic, named PS5, new analogues were designed following medicinal chemistry rules.

## RESULTS

The capabilities of the newly designed compounds to mimic the biological activity of the SOCS1 protein were evaluated in *in vitro* functional assays such as direct binding assays to its natural partner JAK2 kinase and subsequent structure-relationship studies.

We thoroughly investigated the structural and functional factors required for the JAK2 recognition mechanism of a series of cyclic peptidomimetics bearing point mutations and different cycle sizes. We also designed and tested two new KIR-SOCS1 analogues obtained by applying the CLIPS (Chemical Linkage of Peptides on Scaffolds) strategy. All compounds were analyzed in their conformational preferences by circular dichroism and NMR spectroscopy and in their ability to bind JAK2, by the *in vitro*

binding assay based on microscale thermophoresis (MST). To evaluate their cellular activity, all SOCS1 mimetics were analyzed for their stability to serum proteases and were encapsulated in nanoparticles based on PLGA poly (lactic-co-glycolic) acid.

Most of the objectives envisaged in the initial project have been achieved, especially those mostly related to design, chemical synthesis and *in vitro* assays. On the other hand, the phase of selecting and purchasing the reagents for cellular assays was more complex, which were also slowed down by the restrictions on presence in the Federico II research laboratories due to COVID 19. For these reasons, the cellular assays performed on the new selected mimetics are promising but still in progress.

## CONCLUSIONS

The results of this project are crucial for a direct translation of peptidomimetics to specific JAK2 inhibitors which are very promising as SOCS1 mimetics as they show a selective molecular mechanism associated with the onset of inflammation and which may have therapeutic applications in MS (Proximity to cure). The efficacy of JAK-STAT modulation in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was also confirmed in this project.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- La Manna S, Fortuna S, Leone M, Mercurio FA, Di Donato I, Bellavita R, Grieco P, Merlino F, Marasco D. *Ad-hoc modifications of cyclic mimetics of SOCS1 protein: Structural and functional insights.* *Eur J Med Chem.* 2022 Dec 5;243:114781
- Marasco D. *Design and functional investigations of the therapeutic efficacy of novel SOCS1 mimetics in multiple sclerosis.* Annual Scientific Congress Italian MS Society and its Foundation, Roma May 24-26 2022

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2021 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 29.600 €**  
Research project funded by FISM Grant 2021 for the period of 1 year and the amount of € 29,600

# Il CD28 come bersaglio di una strategia terapeutica per prevenire le risposte infiammatorie dei linfociti T helper indotte dai superantigeni virali e batterici nei pazienti con SM



## Loretta Tuosto

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

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Martina Kunkl, Silvana Caristi, Carola Amormino**

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

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

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

## PREMESSE E OBIETTIVI

Molti studi hanno identificato diversi patogeni, incluso lo *Staphylococcus aureus*, come fattori ambientali critici che possono scatenare e/o esacerbare la SM. In particolare, lo *Staphylococcus aureus* produce tossine superantigeniche (SAGs), come SEA e SEB, che sono stati identificati come possibili fattori di rischio per la SM, causando demielinizzazione e aumentando l'infiltrazione di macrofagi e linfociti T nel SNC, quindi esacerbando i segni clinici nell'EAE. L'attività infiammatoria di SEA e SEB si basa sulla loro capacità di innescare l'attivazione policlonale dei linfociti T legando il recettore TCR e la molecola costimolatoria CD28 sui linfociti T, e le molecole MHC di classe II e B7 sulle cellule presentanti l'antigene (APCs). Precedenti studi hanno evidenziato che SEB può legare le molecole TCR e CD28 indipendentemente dall'MHC di classe II, tuttavia il contributo di queste interazioni alla funzione infiammatoria dei SAG stafilococcici è poco chiaro. Partendo da queste evidenze, il presente progetto ha avuto lo scopo di caratterizzare il contributo del CD28 e dei SAGs batterici nell'amplificazione di linfociti T infiammatori nei pazienti con SM.

## RISULTATI

I risultati ottenuti nei linfociti T umani hanno evidenziato che il legame dei SAG dello stafilococco alle molecole MHC di classe II è superfluo per la produzione di citochine infiammatorie, mentre la segnalazione mediata dal TCR e dal

CD28 è necessaria. In accordo con la nota capacità del SEB di aumentare l'affinità di interazione tra CD28 e B7, abbiamo osservato che SEB favorisce l'interazione tra linfociti T e APCs che esprimono B7 e promuove il reclutamento del TCR nell'interfaccia T:APC. I nostri risultati suggeriscono che, rafforzando l'interazione tra il CD28 e B7, il SEB favorisce il reclutamento del TCR nella sinapsi immunologica, inducendo così segnali infiammatori.

Abbiamo ulteriormente esteso questi dati dimostrando che l'interazione dei SAGs SEB e SEA con il TCR e il CD28 induce l'attivazione degli eventi di segnalazione precoci e tardivi che regolano la produzione di citochine infiammatorie anche in assenza di APC che esprimono B7. Partendo da questi dati, abbiamo verificato se SEB e SEA inducessero la produzione di citochine infiammatorie nei linfociti T di pazienti con SMRR trattati con comuni farmaci modificanti di prima linea, come natalizumab (n = 5), interferone-1b (n = 5) e teriflunomide (n = 5). I linfociti T isolati dal sangue periferico di tutti i pazienti SMRR in trattamento hanno prodotto alti livelli di GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$  e IL-6 quando stimolate con SEA o SEB. Poiché specifiche sottopopolazioni di linfociti T esercitano un ruolo cruciale nella patogenesi e nella progressione della SM, come Th1, Th17 e Th1-like Th17, abbiamo anche analizzato l'effetto della stimolazione con SAGs sull'amplificazione di queste specifiche sottopopolazioni T infiammatorie. Sfortunatamente, non abbiamo rilevato alcun aumento

significativo di specifiche popolazioni T in seguito alla stimolazione con SEB o SEA, nonostante l'elevata secrezione di citochine infiammatorie. Questo può essere dovuto al fatto che sia il SEA che il SEB attivano una forte risposta infiammatoria stimolando una percentuale molto bassa di linfociti T che esprimono specifici TCR V $\beta$  (1-5%), quindi l'identificazione di una specifica sottopopolazione di linfociti Th può essere molto difficile (9). Per superare questi problemi, le stesse analisi potrebbero essere eseguite concentrandosi sulle specifiche sottopopolazioni di linfociti T stimolati da SEA e SEB, che possono essere facilmente identificate utilizzando un pannello di anticorpi anti-TCRV $\beta$  specifici.

## CONCLUSIONI

Complessivamente, i risultati di questo progetto pilota dimostrano che i SAg batterici, legando il TCR e CD28, possono attivare una risposta infiammatoria anche in pazienti SMRR stabili in trattamento con farmaci modificanti la malattia, contribuendo probabilmente alle ricadute e all'aggravamento della malattia. Ulteriori esperimenti chiariranno il ruolo di SEB e SEA nell'amplificazione dei linfociti T autoreattivi contro antigeni della mielina nei pazienti con SMRR e l'efficacia di peptidi mimetici dell'interfaccia omodimerica CD28 nell'inibire l'amplificazione SAg-mediata delle cellule T infiammatorie e/o autoreattive nei pazienti con SMRR.

# Selective targeting of CD28 costimulatory molecule as a therapeutic strategy for preventing inflammatory responses of T helper cells induced by viral and bacterial superantigens in MS patients

## INTRODUCTION AND AIMS

Several studies identified microbial infections, including *Staphylococcus aureus*, as critical environmental factors that may trigger and/or exacerbate multiple sclerosis (MS). In particular, *Staphylococcus aureus* produce toxin superantigens (SAGs), such as SEA and SEB, which have been identified as possible risk factors for MS, by causing demyelination and increasing the infiltration of macrophages and T cells into CNS, thus exacerbating the clinical signs in EAE (5). The inflammatory activity of SEA and SEB relies on their capability to trigger polyclonal T-cell activation by binding both T-cell receptor (TCR) and costimulatory receptor CD28 on T cells and MHC class II and B7 molecules on antigen presenting cells (APCs). Previous studies highlighted that SEB may bind TCR and CD28 molecules independently of MHC class II, yet the relative contribution of these interactions to the proinflammatory function of staphylococcal SAGs remained unclear.

Starting from these evidences, the present project aimed to characterize the contribution of CD28 and SAGs in regulating the expansion of inflammatory T cells in MS patients.

## RESULTS

Our data in human primary T cells demonstrate that the binding of staphylococcal SAGs to MHC class II molecules is dispensable for SAGs-mediated inflammatory cytokine

production, whereas TCR- and CD28-mediated signalling are mandatory. In accordance with the known capability of SEB to enhance CD28/B7 engagement, we found that SEB significantly increases the interaction between T cells and B7-expressing APCs and promotes TCR recruitment at the T:APC interface. Our findings suggest that, by strengthening the interaction between CD28 and B7, SEB favours the recruitment of the TCR into the immunological synapse, thus inducing lethal inflammatory signalling. We further extended these data by showing that the engagement of the TCR and CD28 by staphylococcal SEB and SEA induces the activation of both early and late signalling events regulating inflammatory cytokine production also in the absence of B7- expressing APCs. Starting from these data, we analysed whether SEB and SEA induced inflammatory cytokine production in T cells from RRMS patients treated with common first-line modifying drugs, such as natalizumab (n = 5), interferon-1b (n = 5) and teriflunomide (n = 5). T cells isolated from all RRMS patients treated with first-line modifying drugs produced high levels of GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$  and IL-6 when stimulated with SEA or SEB. Since specific T cell subsets exert a crucial role in MS pathogenesis and progression, such as Th1, Th17 and Th1-like Th17, we also analysed the effect of SAG stimulation on the amplification of these inflammatory Th cell subsets. Unfortunately, we did not detect any significant

increase of specific Th cell populations following either SEB or SEA stimulation, despite the high secretion of inflammatory cytokines in culture supernatants. This may be due to the fact that staphylococcal SEA and SEB activate a strong inflammatory response by targeting very low percentage of T cells carrying specific TCR V $\beta$  (1-5%), thus the detection of intracellular cytokines in a specific Th cell subset may be very difficult (9). To overcome these problems, the same analyses could be performed by focusing on the specific CD4+ T cell subpopulations targeted by SEA and SEB, which may be easily identified by using a panel of specific anti-V $\beta$  TCR Abs.

## CONCLUSIONS

Altogether, the results of this pilot project evidence that bacterial SAGs, by targeting TCR and CD28, may activate an inflammatory response in stable RRMS patients treated with disease-modifying therapeutic drugs, likely contributing to relapses and disease exacerbation. Further experiments will elucidate the role SEB and SEA in amplifying myelin autoreactive T cells in RRMS patients and the efficacy of CD28 homodimer interface mimetic peptides in inhibiting SAg-mediated amplification of inflammatory and/or autoreactive T cells in RRMS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/ Publications

- Tuosto L. Editorial: Insights in T Cell Biology: 2021. *Front Immunol.* 2022 Sep 21;13:1039602. doi: 10.3389/fimmu.2022.1039602
- Amormino C, Tedeschi V, Paldino G, Arcieri S, Fiorillo MT, Paiardini A, Tuosto L, Kunkl M. SARS-CoV-2 Spike Does Not Possess Intrinsic Superantigen-like Inflammatory Activity. *Cells.* 2022, Aug 15;11(16):2526. doi: 10.3390/cells11162526
- Tedeschi V, Paladino G, Kunkl M, Paroli M, Sorrentino R, Tuosto L, Fiorillo MT. CD8+ T cell senescence: lights and shadows in viral infections, autoimmune disorders and cancer. *Int J Mol Sci.* 2022, 23:3374. doi: 10.3390/ijms23063374
- Kunkl M, Amormino C, Tedeschi V, Fiorillo MT, Tuosto L. Astrocytes and inflammatory T helper cells: a dangerous liaison in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2022, 13:824411. doi: 10.3389/fimmu.2022.824411
- Kunkl M, Amormino C, Caristi S, Tedeschi V, Fiorillo MT, Levy R, Popugailo A, Kaempfer R, Tuosto L. Binding of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) to B7 Receptors Triggers TCR- and CD28-Mediated Inflammatory Signals in the Absence of MHC Class II Molecules. *Front Immunol.* 2021, 12:723689. doi: 10.3389/fimmu.2021.723689

### Comunicazioni a Congressi/ Congress Presentations

- Kunkl M, Amormino C, Caristi S, Tedeschi V, Fiorillo MT, Levy R, Popugailo A, Kaempfer R and Tuosto L. The binding of SEB to TCR and CD28/B7 costimulatory axis promotes the activation of inflammatory signals in the absence of MHC class II molecules. EMBO Workshop "Lymphocyte antigen receptor signaling", 28 May-01 June 2022, Castelnuovo Berardenga, Siena, Italy

- Kunkl M, Amormino C, Caristi S, Tedeschi V, Fiorillo MT, Levy R, Popugailo A, Kaempfer R and Tuosto L. Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) activates proinflammatory signals mediated by TCR and CD28 in the absence of MHC class II molecules. XIII National Congress SIICA, 23-26 May 2022, Naples, Italy
- Kunkl M, Amormino C, Frascolla S, Sambucci M, De Bardi M, Caristi S, Arcieri S, Battistini L and Loretta Tuosto. CD28-Associated Class 1A PI3K Regulates IL-22-Mediated Epithelial Barrier functions in human T lymphocytes. XII National Congress SIICA, 26-28 May 2021
- Kunkl M, Amormino C, Caristi S, Tedeschi V, Fiorillo MT, Levy R, Popugailo A, Kaempfer R, Tuosto L. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) activates TCR- and CD28- mediated inflammatory signals in the absence of MHC class II molecules. ECI 2021, 1-4September 2021
- Kunkl M, Amormino C, Frascolla S, Sambucci M, De Bardi M, Caristi S, Arcieri S, Battistini L and Loretta Tuosto. CD28 individual signaling up-regulates IL-22 expression and IL-22-mediated effector functions in human T lymphocytes. ECI 2021 1-4September 2021
- Sambucci M, Kunkl M, Ruggieri S, Amormino C, Tortorella C, Gasperini C, Battistini L and Loretta Tuosto. CD28 and associated class 1A PI3K regulates the cellular metabolic programs associated to pro-inflammatory T cell responses in Multiple Sclerosis. XXIX AINI Congress, 15-19 September 2021, Verona, Italy

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2020 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30,000 €**  
Research project funded by FISM Grant 2020 for the period of one year and the amount of € 30,000

# Verso l'eliminazione farmacologica specifica di linfociti T patogenici implicati nella sclerosi multipla



## Ildiko Szabo

*Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Beatrice Angi, Tatiana Varanita, Valentina Scattolini, Marta Favero, Veronica Carpanese**

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

**Paolo Gallo, Marco Puthenparampil**, *Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia*

**Lucia Biasutto**, *CNR Istituto di Neuroscienze, Padova, Padova*

**Cristina Paradisi**, *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Italia*

**Andrea Mattarei**, *Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Padova, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa di natura cronica, caratterizzata da un accumulo di cellule immunitarie nel Sistema Nervoso Centrale (SNC). Tra queste, vi sono un tipo particolare di linfociti T, detti linfociti T effettori cronicamente attivi. Nei pazienti con SM, queste cellule vengono attivate a livello periferico e migrano poi nel SNC dove danno origine a una reazione immunitaria anomala. Si crea così uno stato infiammatorio che porta alla demielinizzazione, ovvero al danneggiamento della guaina che circonda e isola le fibre nervose.

Vista l'importanza svolta da questi linfociti nel decorso della malattia, è di profondo interesse lo sviluppo di una strategia terapeutica che porti all'eliminazione specifica di queste cellule, senza compromettere il funzionamento di altre componenti del sistema immunitario.

I linfociti T effettori cronicamente attivi sono caratterizzati dalla presenza sulla loro membrana plasmatica, di un canale del potassio, il quale è importante per la loro proliferazione e attivazione. Poiché queste cellule presentano una elevata quantità di questo canale del potassio, andando a bersagliare questa proteina, è possibile colpire ed eliminare in modo specifico queste cellule. Per far ciò, sfruttiamo dei composti sviluppati dal nostro laboratorio in grado di indurre la morte in cellule che presentano alti livelli della proteina. In particolare, uno dei nostri composti è in grado di bersagliare il canale del potassio presente anche sulla membrana dei mitocondri, le centrali energetiche della cellula, portando queste cellule al suicidio.

Gli obiettivi del progetto erano quelli di studiare gli effetti dei composti che bersagliano il canale del potassio su linfociti T patologici di pazienti con SM e la loro capacità di pro-

vocare la morte di queste cellule. Inoltre questi composti sono stati utilizzati in modelli animali di SM per valutare la loro capacità di migliorare la progressione della patologia.

## RISULTATI

Abbiamo condotto una serie di esperimenti volti a dimostrare che i composti prodotti dal nostro laboratorio sono in grado di eliminare in modo specifico i linfociti T effettori cronicamente attivi, grazie al fatto che questi sono caratterizzati da alti livelli del canale di potassio di interesse.

Per far ciò, abbiamo testato i composti su linfociti T patologici di pazienti trattati con il farmaco Natalizumab, il quale è clinicamente in uso in quanto impedisce a queste cellule di attraversare la barriera ematoencefalica. In particolare, abbiamo estratto i leucociti dal sangue di pazienti, e li abbiamo trattati con i farmaci descritti sopra. Questo esperimento ha dimostrato che il composto che bersaglia il canale del potassio mitocondriale, è in grado di diminuire significativamente il numero di linfociti T effettori cronicamente attivi, senza alterare la vitalità delle altre cellule immunitarie. Abbiamo inoltre osservato che la diminuzione di queste cellule è dovuta alla capacità del composto di portare alla loro morte.

Abbiamo poi testato lo stesso composto in topi in cui viene indotta l'Encefalomyelite Sperimentale Autoimmune (ESA), un modello animale che ricapitola gli eventi biologici caratterizzanti la SM. Anche nel modello animale ESA, il trattamento con il nostro farmaco permette l'eliminazione selettiva dei linfociti patologici responsabili della malattia, senza alterare le altre popolazioni immunitarie. Inoltre, gli animali trattati mostrano un recupero delle capacità motorie. Questo miglioramento è accompagnato da

una drastica riduzione della demielinizzazione a livello del SNC. Questi dati suggeriscono che l'eliminazione di questi linfociti T effettori è sufficiente ad arrestare la progressione della malattia.

## CONCLUSIONI

Il nostro progetto di ricerca pone luce sulle possibili strategie che possono essere impiegate per il trattamento della SM. In particolare mira ad utilizzare come target un canale del potassio mitocondriale abbondantemente presente nei linfociti responsabili della malattia. Per la prima

volta, proponiamo l'utilizzo di composti in grado di bersagliare questo canale e quindi di indurre selettivamente il suicidio dei linfociti patologici, per il trattamento della SM. A differenza di un altro inibitore del canale del potassio che diminuisce l'attivazione dei linfociti T e che è attualmente in sperimentazione clinica, il nostro composto è in grado di individuare ed eliminare selettivamente le cellule immunitarie responsabili della malattia. L'utilizzo del nostro composto in combinazione alle numerose terapie che modificano l'andamento della SM, potrebbe notevolmente diminuire la progressione di questa patologia.

# Towards specific elimination of autoreactive pathogenic T lymphocytes implicated in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder in which inflammatory cells from the peripheral blood (PB) migrate to the central nervous system (CNS) and cause demyelination and subsequent axonal degeneration. Several lines of evidence support an early role of chronically activated autoreactive T cells. These cells interact with antigen-presenting cells and B cells and, after activation, are able to cross the blood-brain barrier and sustain inflammation leading to demyelination. Targeting of chronically activated autoreactive T cells (TEMs) involved in MS pathogenesis, possibly without causing profound immunosuppression or toxicity, might be thus a very useful strategy.

These pathologic T lymphocytes are characterized by the presence of a potassium channel in their plasma membrane, which is crucial for their proliferation. The same channel is located also in the mitochondria, the powerhouse of the cells, where their inhibition induces programmed cell death, called apoptosis. We proposed therefore to test a new strategy to pharmacologically target this potassium channel, in order to selectively kill chronically activated TEMs. We exploited new molecules that have been synthesized and characterized in vivo by our team and are able to selectively induce apoptosis in cells expressing high levels of this potassium channel, by blocking the mitochondrial counterpart of the channel and thereby triggering suicide of the pathologic cells.

The objectives of our project were i) to test the effects of our compounds on the survival of pathologic cells of MS patients; ii) to test the effect of these compounds on the progression of MS in preclinical murine models.

## RESULTS

We performed a series of experiments in order to prove that our compounds can selectively eliminate the chronically activated effector T cells. First, leukocytes were isolated from patients treated with Natalizumab, a drug used in the clinic and able to block the entry of pathologic T cells into the brain. The peripheral blood of these patients therefore is enriched in pathologic T cells. We obtained evidence that our drugs were able to specifically kill chronically activated T cells only, by inducing apoptosis in these samples. In parallel, we tested our molecules in the murine model of MS, named EAE, that is able to recapitulate the characteristics of MS. Also in this case, a selective killing of these T cells occurred, without affecting other immune cell populations. The treated animals showed an ameliorated myelination and motor performance. These data suggest that killing of autoreactive pathologic T cells might be sufficient to halt disease progression.

## CONCLUSIONS

Our project reveals a possible new strategy that might be exploited for the treatment of MS. In particular, the project proposes a mitochondrial potassium channel as pharmacological target. At difference with drugs acting on the same channel but located in the plasma membrane of the cells, our compounds can induce cell death of pathologic lymphocytes only. The use of our compounds, possibly together with already used disease-modifying drugs, may significantly reduce MS progression.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Capera J, Pérez-Verdaguer M, Peruzzo R, Navarro-Pérez M, Martínez-Pinna J, Alberola-Die A, Morales A, Leanza L, Szabó I, Felipe A. A novel mitochondrial Kv1.3-caveolin axis controls cell survival and apoptosis. *Elife*. 2021 Jul 1;10:e69099. doi: 10.7554/eLife.69099
- Checchetto, V., L. Leanza, D. De Stefani, R. Rizzuto, E. Gulbins and I. Szabo (2021). "Mitochondrial K(+) channels and their implications for disease mechanisms." *Pharmacol Ther* 227: 107874
- Parrasia S, Rossa A, Varanita T, Checchetto V, De Lorenzi R, Zoratti M, Paradisi C, Ruzza P, Mattarei A, Szabò I, Biasutto L. An Angiopep2-PAPTP Construct Overcomes the Blood-Brain Barrier. *New Perspectives against Brain Tumors. Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Feb 6;14(2):129. doi: 10.3390/ph14020129
- Peruzzo R, Mattarei A, Azzolini M, Becker-Flegler KA, Romio M, Rigoni G, Carrer A, Biasutto L, Parrasia S, Kadow S, Managò A, Urbani A, Rossa A, Semenzato G, Soriano ME, Trentin L, Ahmad S, Edwards M, Gulbins E, Paradisi C, Zoratti M, Leanza L, Szabò I. Insight into the mechanism of cytotoxicity of membrane-permeant psoralenic Kv1.3 channel inhibitors by chemical dissection of a novel member of the family. *Redox Biol*. 2020 Oct;37:101705. doi: 10.1016/j.redox.2020.101705
- Urbani A, Prosdocimi E, Carrer A, Checchetto V, Szabò I. Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 5;8:620081. doi: 10.3389/fcell.2020.620081. eCollection 2020
- Varanita T, Angi B, Scattolini V, Szabo I. Kv1.3 K+ Channel Physiology Assessed by Genetic and Pharmacological Modulation. *Physiology (Bethesda)*. 2023 Jan 1;38(1):0. doi: 10.1152/physiol.00010.2022

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 158.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 12 months) and the amount of € 158,000

---

# **Neuroriabilitazione e qualità della vita**

Neurorehabilitation  
and quality of life

---

# L'osservazione d'azione e l'immaginazione motoria causano affaticamento nella SM? Valutazione della loro applicabilità nelle forme progressive



## Ambra Bisio

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Istituto di Fisiologia umana, Università degli Studi di Genova, Genova Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Monica Biggio, Marco Bove, Laura Bonzano, Laura Avanzino, Andrea Albergoni**

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

**Ludovico Pedullà, Giampaolo Brichetto, Andrea Tacchino, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La fatica è uno dei sintomi più comuni e invalidanti nelle persone con sclerosi multipla (PcSM) e viene riportato da più del 70% della popolazione. È essenziale distinguere tra la fatica percepita, definita come una sensazione soggettiva di esaurimento, mancanza di energia e stanchezza, e l'affaticamento da prestazione, che si riferisce ai cali di prestazione dipendenti dall'esercizio, sia esso cognitivo che motorio. La fatica e l'affaticamento prevalgono come sintomo nei pazienti con forme progressive della malattia. Per questo motivo e in linea con le priorità di ricerca dell'International Progressive MS Alliance, è necessario concentrarsi su queste forme per determinare i trattamenti riabilitativi più adatti, anche in termini di affaticamento. Un importante obiettivo è quello di trovare nuovi interventi che massimizzino l'efficacia e riducano contemporaneamente l'affaticamento associato al compito. Alla fine degli anni 90, sono state proposte due metodologie cognitive, ma con risvolti sul sistema motorio, in aggiunta alle strategie convenzionali di riabilitazione per promuovere l'apprendimento motorio e la plasticità: l'osservazione dell'azione (OA) e l'immaginazione motoria (IM). È stato dimostrato che queste tecniche sono in grado di attivare il sistema sensorimotorio a livello corticale anche quando il soggetto non si muove. Per questo motivo OA e IM sono state proposte come trattamento aggiuntivo alla pratica motoria. Inoltre, la loro applicazione potrebbe limitare l'affaticamento indotto dalla riabilitazione convenzionale. Tuttavia, al momento non è noto se

queste strategie di riabilitazione innovative siano causa di affaticamento cognitivo e/o motorio. Per questo motivo, lo scopo di questo progetto è stato quello di testare se OA ed IM inducono affaticamento cognitivo e/o motorio rispetto a un training motorio e a una condizione di controllo attivo. Il progetto ha coinvolto PcSM con forma progressiva perché sono coloro che potrebbero beneficiare maggiormente di queste tecniche. I dati di PcMS sono stati confrontati con quelli di un gruppo di soggetti sani di controllo. Al fine di valutare la prestazione motoria e cognitiva, sono state effettuate misure comportamentali (movimenti fini della mano), neurofisiologiche (valutazione dell'attività dell'area motoria primaria mediante stimolazione magnetica transcranica-TMS), cognitive (trail making test - TMT-A e TMT-B, e test delle matrici attentive - AMT) e scale di percezione dell'affaticamento (visual analog scale, soltanto nei pazienti) prima, immediatamente dopo l'intervento e 60 minuti dopo la sua conclusione.

## RISULTATI

Sono stati reclutati 21 PcSM e 20 soggetti di controllo. Per quanto concerne l'aspetto motorio, l'analisi dei dati comportamentali ha mostrato che nei PcSM i trattamenti proposti non hanno portato a un miglioramento significativo della performance motoria, mentre nel gruppo di controllo si osserva un miglioramento al termine di tutti i trattamenti sperimentali. Questo risultato trova un riscontro nei dati neurofisiologici. Infatti, nei soggetti sani il training moto-

rio, l'OA e la IM hanno incrementato l'eccitabilità corticale. Nessuna variazione è stata osservata nei PcSM. Tuttavia, una tendenza all'aumento dopo la IM sembra suggerire che le diverse tipologie di training hanno un effetto specifico sui meccanismi di neuroplasticità in PcSM, anche in una fase progressiva della patologia. Per quanto riguarda l'aspetto cognitivo, nei PcSM i risultati del TMT-A mostrano una riduzione del tempo di esecuzione in ogni condizione sperimentale, imputabile a un apprendimento del compito. Nessun cambiamento è emerso dall'analisi dei risultati degli altri test cognitivi. L'analisi dei punteggi VAS di tipo motorio e cognitivo ha evidenziato un aumento nella percezione dell'affaticamento a seguito del training motorio e di quello effettuato tramite OA. Una correlazione positiva è stata osservata fra i punteggi VAS e la performance motoria nella condizione OA.

## CONCLUSIONI

I training proposti non hanno evocato misurabili segni di affaticamento nelle PcSM con forma progressiva, se non nella valutazione auto-riportata dai pazienti, che ha identificato il training motorio e quello mediante osservazione d'azione come affaticanti. Questo potrebbe aver condizionato la performance che, in media, non migliora dopo il training. Tuttavia, l'aumento di eccitabilità corticale dopo l'immaginazione motoria, seppur non significativo, lascia aperti spiragli di ulteriore indagine di questa metodica in PcSM con forma progressiva. D'altra parte, nella condizione OA i soggetti che hanno riportato maggior affaticamento sono stati coloro che hanno migliorato la performance motoria. Questi risultati suggerirebbero quindi di valutare attentamente le caratteristiche del paziente in termini di risorse che potrà effettivamente dedicare al compito in modo da proporre un training idoneo alle capacità residue del soggetto.

# Can action observation and motor imagery training cause fatigability in MS? Assessment of their feasibility in the progressive forms

## INTRODUCTION AND AIMS

Fatigue is one of the most common and disabling symptoms in people with multiple sclerosis (PwMS) reported in more than the 70% of the population. It is essential to distinguish between perceived fatigue, which is reported as the subjective feeling of exhaustion, lack of energy or tiredness, and the performance fatigability, which refers to use-dependent decline in performance. Fatigue and fatigability have higher prevalence in people with progressive forms of the disease. For this reason, and in line with the International Progressive MS Alliance research priorities, there is a need to focus on the progressive forms in order to determine the most suitable rehabilitation treatments, tailored on patient's features also in term of fatigability. An important goal would be to find new interventions maximizing the effectiveness and contemporary reducing the fatigability associated to the task. From the late 90s, two methodologies have been proposed as add-on to the conventional motor rehabilitation strategies, namely action observation (AO) and motor imagery (MI). These cognitive stimulation techniques have been shown to activate the sensorimotor system at cortical level without requiring the subject to move, and to promote motor learning and plasticity. AO and MI were proposed as interventions additional to motor practice in order to stimulate sensorimotor plasticity and re-learning. For these reasons, they could be particularly indicated for patients suffering from fatigue since they could

limit the fatigability induced by the physical rehabilitation and boost its effectiveness. Nevertheless, it is presently unknown whether these new rehabilitation strategies cause motor and/or cognitive fatigability. The aim of this project was to test whether trainings based on AO and MI improved the motor performance without inducing cognitive and motor fatigabilities in comparison with a physical training session and an active control condition. The project involved PwMS with progressive form because they are those who might benefit more from these techniques than patients with other form of MS. Data from PcMS were compared with those from a group of healthy control subjects. In order to evaluate motor and cognitive performance, behavioural (fine hand movements), neurophysiological (assessment of primary motor area activity using transcranial magnetic stimulation-TMS), cognitive (trail making test - TMT-A and TMT-B, and attentional matrix test - AMT) and fatigue perception scales (visual analog scale, in patients only) before, immediately after the intervention and 60 minutes after its conclusion.

## RESULTS

Twenty-one PwMS and 20 control subjects were recruited. Concerning the motor domain, the analysis of the behavioural data showed that in PwMS the proposed treatments did not led to an improvement in motor performance, whilst in the control group an improvement was

observed at the end of all experimental treatments. This finding is supported by neurophysiological data. In fact, in healthy subjects' motor training, AO and MI increased the cortical excitability. No change was observed in PwMS, except an increasing trend after MI suggesting that the different types of training have specific effects on neuroplastic mechanisms in PwMS with a progressive form of the disease. Concerning the cognitive domain, in PwMS the results of the TMT-A showed a reduction of the execution time in each experimental condition, attributable to a learning of the task. No change emerged from the analysis of the results of the other cognitive tests. The analysis of the motor and cognitive VAS scores showed an increase in the perception of fatigability following motor training and AO training. A positive correlation appeared between VAS scores and motor performance in the AO condition.

## CONCLUSIONS

The proposed trainings did not evoke measurable signs of fatigue in PwMS with progressive form, except in the self-reported evaluation by the patients, which identified motor training and action observation training as fatiguing. This may have influenced performance, which, on average, did not improve after the training. However, the increase of cortical excitability after motor imagery, although not significant, open new possibilities to further investigate this technique in in PwMS with progressive form. On the other hand, in the AO condition the subjects who reported greater fatigue were those who improved motor performance. These results would suggest to carefully evaluate the patient's characteristics in terms of resources that she/he can actually dedicate to the task in order to propose an individualized training based on the residual functions of the subject.



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

- *Ambra Bisio, Monica Biggio, Ludovico Pedullà, Andrea Albergoni, Andrea Tacchino, Laura Avanzino, Giampaolo Brichetto, Marco Bove. Does action observation improve motor performance without causing fatigability in progressive forms of multiple sclerosis? 26th RIMS Digital Annual Conference, November 26-27, Digital edition*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 15 mesi) e l'ammontare di 52.845 €**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 year (extended by 15 months) and the amount of € 52,845

# Sensibilità al calore nella sclerosi multipla: uso combinato di questionari e test funzionali



## Giampiero Merati

*Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita (DBSV), Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Martina Anna Maggioni, Susanna Rampichini, Hans Christian Gunga**

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

**Davide Cattaneo**, *Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

**Claudio Marcello Solaro**, *Ass. Silenziosi Operai della Croce Onlus, Moncrivello (VC), Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Un'alta percentuale di persone con SM (PwMS) sperimenta peggioramenti transitori dei segni clinici e dei sintomi neurologici durante l'esposizione a un ambiente caldo e umido e/o durante l'esercizio fisico. Ad oggi, non è chiaro se questo fenomeno dipenda da un'intolleranza periferica o centrale dell'organismo all'aumento della temperatura ambientale o se soggetti diversi possano esibire meccanismi differenti di sensibilità al calore. Lo scopo del presente progetto era quello di valutare il meccanismo centrale di adattamento della temperatura interna del core dell'organismo (CBT) a un esercizio standard e di confrontarlo con il punteggio di un nuovo questionario ad hoc sulla sensibilità al calore nelle PwMS. Poiché la CBT è sotto il controllo del sistema nervoso autonomo, il secondo obiettivo del progetto era di studiare la relazione tra la capacità termoregolatoria e la presenza di una disfunzione autonoma basale o indotta dall'esercizio.

## RISULTATI

Sono stati reclutati 14 PwMS (età > 18 anni, diagnosi confermata di SM, forma recidivante-remittente di SM, cammino autonomo) e 14 soggetti sani di pari età e sesso (HS). I partecipanti allo studio sono stati dotati di sensori di temperatura e frequenza cardiaca (HR) indossabili e sono stati invitati a completare un Test di Cammino di 6 minuti (6MWT), a una temperatura ambientale costante.

Come previsto, durante il 6MWT la media della distanza coperta dagli HS è quasi raddoppiata rispetto a quella coperta dal gruppo PwMS.

Il tempo di adattamento della CBT all'esercizio (primi minuti del 6MWT) ha mostrato un trend verso valori più alti

nelle PwMS rispetto agli HS, che tuttavia era al di sotto del limite di significatività statistica. Tuttavia, un maggior numero di partecipanti del gruppo PwMS ha ridotto volontariamente la velocità di cammino durante la seconda metà del 6MWT, riducendo così la CBT collegata al lavoro metabolico svolto.

Allo stesso modo, l'adattamento della HR all'inizio dell'esercizio e il recupero della HR dopo il test non differivano significativamente tra i gruppi. Tuttavia, era presente un livello basale significativamente più alto della HR nel gruppo PwMS, suggerendo che un certo grado di disautonomia del controllo cardiovascolare fosse presente in questo gruppo. Ciò è stato anche confermato da una chiara lentezza nell'aggiustamento della HR sia all'inizio che alla fine del test di esercizio. Questi dati sono in accordo con lavori precedenti: alcuni autori hanno ipotizzato che lo stato di disautonomia possa influire anche sulla termoregolazione durante l'esercizio, ma ad oggi il possibile meccanismo che legherebbe i due fattori rimane elusivo.

Per quanto riguarda la somministrazione del questionario sulla sensibilità termica (HIS-Q), la prima versione del questionario era caratterizzata da 60 item divisi in 4 tipi di esposizione al calore: stagione calda; bagni/doccia caldi; attività fisica e febbre. L'analisi statistica dei dati ha mostrato differenze significative tra HC e PwMS nei punteggi totali (PwMS = 4,3 punti, HS = 1,6 punti,  $p < 0,001$ ), nella stagione calda (PwMS = 4,0 punti, HS = 1,7 punti,  $p < 0,001$ ), nell'attività fisica (PwMS = 5,3 punti, HS = 2,7 punti  $p < 0,001$ ), nei punteggi durante febbre (PwMS = 4,3 punti, HS = 1,6 punti  $p < 0,001$ ) e in quelli relativi ai bagni caldi (PwMS = 3,3 punti, HS = 0,5 punti,  $p < 0,001$ ).

## CONCLUSIONI

In questo progetto abbiamo dimostrato un adattamento simile della CBT al 6MWT nelle PwMS rispetto ai soggetti sani (cioè, una produzione e dissipazione di calore comparabile tra i gruppi), così come uno sforzo cardiaco simile (cioè, un carico cardio-metabolico interno comparabile tra i gruppi). Inoltre, si è dimostrato un carico percettivo simile tra i gruppi, anche se la distanza percorsa nel 6MWT era quasi il doppio nel gruppo di soggetti sani. Tuttavia, alcuni individui nel gruppo PwMS hanno ridotto volontariamente la velocità di camminata durante la seconda metà del 6MWT, suggerendo una possibile necessità di ridurre la CBT legata all'esercizio.

In considerazione di questi risultati, crediamo che la somministrazione sia dei questionari ad hoc sulla termo-sensibilità che di semplici test funzionali durante i quali misu-

rare l'adattamento della CBT all'esercizio potrebbe essere utile nell'identificazione precoce dei PwSM più sensibili al calore, sia ambientale che prodotto dal metabolismo. Tali PwMS potrebbero essere candidati per nuove terapie finalizzate a ridurre la temperatura superficiale del corpo (ad esempio, mediante corsetti refrigerati) durante l'esercizio fisico o l'esposizione a temperature ambientali elevate (Prossimità alla cura). Dal punto di vista della patogenesi della SM (Prossimità alla scoperta di nuovi meccanismi patogenetici), i risultati dei nostri esperimenti sembrano confermare i pochi dati già presenti in letteratura scientifica che non vi sia alcun deficit nei meccanismi centrali di controllo termoregolatorio durante esercizio nei PwMS. Questo sposterebbe l'attenzione futura sulle possibili problematiche nei meccanismi termoregolatori periferici che governano il riflesso sudomotorio nella SM.

# Assessing heat sensitivity in multiple sclerosis: combined use of questionnaire and functional testing

## INTRODUCTION AND AIMS

A high percentage of people with MS (PwMS) experiences transient worsening of clinical signs and neurological symptoms upon exposure to a hot and humid environment and/or during physical exercise. It is not clear to date whether this phenomenon depends more on peripheral or central core body intolerance to increased temperature, and whether different subjects may even exhibit different mechanisms of heat sensitivity. The aim of the present project was to evaluate the central mechanism of core body temperature (CBT) adaptation to a standard exercise and to compare it with the score of a new ad hoc questionnaire on heat sensitivity in subjects with multiple sclerosis. As CBT is under the control of autonomic system, the second aim of the project was to study the relationship between thermoregulatory capacity and the presence of a basal or exercise-induced autonomic dysfunction.

## RESULTS

Fourteen PwMS and 14 aged- and sex-matched healthy subjects (HS) were recruited (age > 18 years, confirmed diagnosis of MS, relapsing-remitting form of MS, autonomous walking). Participants were instrumented with wearable temperature and heart rate (HR) sensors and were asked to complete a 6-minute Walk Test (6MWT), at a constant room temperature.

As expected, during the 6MWT the mean distance covered by HS almost doubled that covered by the PwMS group.

The time of CBT adaptation to exercise (first minutes of the 6MWT) showed a trend towards higher values in PwMS than in HS, which was however below the limit of statistical significance. However, interestingly, a higher number of participants from PwMS group reduced voluntarily the walking velocity during the second half of the 6MWT, thus reducing the CBT due to the metabolic work done.

Similarly, the HR adaptation at exercise onset and the full HR recovery after the test did not significantly differ between groups. However, a significantly higher baseline level of HR was present in the PwMS group, suggesting that a certain degree of dysautonomia of cardiovascular control was present in this group. This was also corroborated by a clear slowness in HR adjustment both at the beginning and at the end of the workload. These data are in agreement with previous works: some Authors have hypothesized that the dysautonomic state may influence also the thermoregulation during exercise, but to date the possible mechanism that would link the two factors remains elusive.

As for the questionnaire administration on thermal sensitivity (HIS-Q), the questionnaires were administered to patients and controls. The first version of the questionnaire was characterized by 60 items divided in 4 types of heat exposure: hot season; hot bath/showers; physical activity and fever. The statistical analysis on these data showed a significant differences between HC and PwMS in total scores (PwMS = 4.3 points, HS = 1.6 points,  $p < 0.001$ ) and Hot Season (PwMS = 4.0 points, HS = 1.7 points,  $p < 0.001$ ), physi-

cal activity (PwMS = 5.3 points, HS = 2.7 points  $p < 0.001$ ), fever scores (PwMS = 4.3 points, HS = 1.6 points  $p < 0.001$ ), and in hot baths score (PwMS = 3.3 points, HS = 0.5 points,  $p < 0.001$ ).

## CONCLUSIONS

We demonstrated a similar adaptation of CBT to the 6MWT in PwMS compared to HS (i.e., a comparable acute heat production and dissipation between groups), as well as a similar cardiac effort (i.e., a comparable cardiometabolic internal load between groups). In addition, the similar rate of perceived exertion demonstrated a similar perceptual load between groups, although the distance traveled in the 6MWT was almost double in the HS group. However, some individuals in the PwMS group reduced voluntarily the walking velocity during the second half of the 6MWT, suggesting a possible need for reduce exercise-related CBT. In the light of these results, we believe that the administra-

tion of both ad hoc questionnaires on thermo-sensitivity and simple functional tests during which to measure the adaptation of CBT to exercise could be useful in early identification of PwSM more sensitive to heat, both environmental and metabolic. Such PwMS could be candidates for new therapies aimed at reducing the surface temperature of the body (for example, by means of cooled corsets) during physical exercise or exposure to high environmental heat (Proximity to cure). From the point of view of the pathogenesis of MS (Proximity to find new pathogenetic mechanisms), the results of our experiments seem to confirm the few data already present in the scientific literature that there is no deficit in the mechanism of thermoregulatory control to exercise in PwMS. This would shift the future attention on the possible failure in thermoregulatory mechanisms in MS towards the peripheral mechanisms that govern the sudomotor reflex.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Gervasoni E, Bertoni R, Anastasi D, Solaro C, Di Giovanni R, Grange E, Gunga HC, Rovaris M, Cattaneo D, Maggioni MA, Merati G. Acute thermoregulatory and cardiovascular response to sub-maximal exercise in people with multiple sclerosis. *Frontiers in Neuroimmunology*, June 2022
- Merati G, Gervasoni E, Anastasi D, Bertoni R, Solaro C, Di Giovanni R, Grange E, Maggioni MA, Gunga HC, Rovaris M, Cattaneo D. Assessing heat sensitivity in multiple sclerosis: combined use of questionnaire and functional testing. *Convegno Nazionale FISM, Roma, mag 2022*

**Progetto di ricerca finanziato da FISM Grant 2019 per il periodo di 1 anno (prorogato di 12 mesi) per un totale di 28.694,74 €.**

Research project funded by FISM Grant 2019 for the period of 1 years (extended by 12 months) and the amount of € 28,694.74

# 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



## Sofia Straudi

UO Medicina Riabilitativa, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione,  
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Andrea Baroni, Giulia Fregna, Giada Milani, Giulia Zani, Nino Basaglia**

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

**Giacomo Severini, School of Electrical and Electronic Engineering, University College Dublin, Dublin, Ireland**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Spesso la sclerosi multipla (SM) si caratterizza per la presenza sia di disordini dell'equilibrio, sia di disordini cognitivi, ovvero di quelle funzioni del cervello quali l'attenzione e la memoria. In ambito riabilitativo, gli aspetti cognitivi non devono essere considerati come una dimensione separata dagli aspetti motori, ad esempio l'attenzione agisce sul controllo dell'equilibrio. Inoltre, nella vita quotidiana è possibile osservare la compresenza dei due aspetti: basti pensare a quando si cammina e contemporaneamente si parla. Tale compresenza è definita dual-task. Il trattamento riabilitativo dovrebbe quindi tenere conto di entrambi questi aspetti, proponendo attività che potenzino la performance nel dual-task. La riabilitazione con videogiochi potrebbe essere uno strumento utile in tal senso, in quanto può favorire il trattamento sia dell'equilibrio sia degli aspetti cognitivi contemporaneamente. Inoltre, rispetto a trattamenti più "classici", la riabilitazione con videogiochi aumenta la motivazione, favorendo l'acquisizione di nuove competenze. È inoltre meno dispendiosa e più "versatile" in quanto è possibile proseguire il trattamento riabilitativo anche al domicilio. Con questo studio clinico abbiamo voluto confrontarne gli effetti rispetto ai trattamenti "classici" per l'equilibrio, sia per quanto riguarda il miglioramento dell'equilibrio, sia delle funzioni cognitive in generale, della fatica e della qualità di vita.

## RISULTATI

Hanno partecipato a questo studio 48 persone con SM delle quali 36 femmine e con un'età media di 55 anni. Le persone coinvolte avevano delle difficoltà di equilibrio, tuttavia erano in grado di camminare autonomamente senza aver necessità di un bastone o di un deambulatore. Il nostro programma riabilitativo è consistito in 12 sedute di riabilitazione (tre sedute a settimana per quattro settimane). Metà delle persone hanno ricevuto una riabilitazione con videogiochi (X-Box 360 Kinect, Microsoft, Inc., Redmond, WA) e l'altra metà, in maniera casuale, ha ricevuto un trattamento riabilitativo convenzionale per il recupero dell'equilibrio (pedana stabilometrica). Tutte le persone hanno concluso la riabilitazione senza difficoltà. Alla fine della riabilitazione le persone con SM hanno riportato benefici non solo riguardanti la loro capacità di muoversi e il loro equilibrio, ma anche un miglioramento del tono dell'umore, della fatica percepita e della disabilità. Al contrario, non abbiamo riscontrato un miglioramento dell'attenzione. Infine, una riduzione dell'ansia è stata riscontrata solo nel gruppo che è stato trattato con videogiochi.

## CONCLUSIONI

Un programma supervisionato di riabilitazione con videogiochi può essere una valida opportunità per migliorare diverse funzioni e attività nelle persone con SM e con un'autonomia nel cammino. In particolare, il trattamento riabilitativo può portare a dei benefici riguardanti non solo la capacità di muoversi e l'equilibrio, ma anche il benessere psico-fisico, la fatica e la percezione della disabilità. L'utilizzo di videogiochi infatti può essere un valido aiuto per migliorare il coinvolgimento delle persone durante la riabilitazione, che giocando, imparano e migliorano le proprie capacità. La possibilità di allenare non solo le capacità motorie ma anche cognitive, come l'attenzione ad esem-

pio, durante una seduta, è sicuramente di interesse per le persone con SM che spesso lamentano difficoltà non solo motorie ma anche attentive. Tuttavia, dispositivi specificamente orientati al miglioramento delle funzioni cognitive sono necessari per raggiungere tale obiettivo. Questo studio, oltre a fornire indicazioni per un utilizzo non solo in ambulatorio, ma anche a domicilio di dispositivi commerciali per migliorare le capacità delle persone con SM, getta le basi per studi futuri, dove, mediante tecnologie più sofisticate, si potrà utilizzare il "gioco" come strumento personalizzato per le difficoltà di ogni persona con SM.

# The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) often causes balance alterations and cognitive disorders, thus compromising cerebral functions such as attention and memory. In rehabilitation, cognitive functions need to be considered along with motor abilities, given that attention drives balance control. Moreover, during activities of daily living is possible to view the influence of these two elements directly: for example, when we walk and speak simultaneously. This co-existence is called "dual-task". Rehabilitation should consider both aspects, proposing activities helpful for improving dual-task performance. Video games therapy could be a valuable tool for this purpose since it can contemporarily promote motor and cognitive training.

Furthermore, compared to conventional treatments, it can increase engagement, which helps learn new skills. It is also less expensive and adaptable and can be used to pursue therapeutic intervention at home. In this study, we wanted to compare video games therapy to conventional treatment in terms of balance, cognitive functioning, fatigue and quality of life outcomes.

## RESULTS

48 people with MS participated in the study, including 36 women with an average age of 55. The subjects enrolled had balance impairments; however, they could independently walk without a stick or rollator. Our rehabilitation program consisted of 12 sessions (three sessions per week for four weeks). Half of the people received video games therapy

(X-Box 360 Kinect, Microsoft, Inc., Redmond, WA), while the other half randomly did conventional treatment to increase their balance ability (Balance Platform Training). All the people concluded the program without difficulties. At the end of their rehabilitation intervention, SM people reported improvements not only in mobility and balance but also in terms of mood, fatigue perceived, and disability. On the contrary, we did not find improvements in attention. In the end, a reduction in anxiety symptoms was noticed only in the video games therapy group.

## CONCLUSIONS

Supervised video games therapy can be a good opportunity for increasing several functions and activities in people with SM and independent walking. In particular, this rehabilitation treatment can lead to benefits in mobility and balance and for psycho-physic well-being, fatigue and self-reported disability. The use of video games could be a valuable means for increasing people's engagement during rehabilitation which, during playing, learn and enhance their abilities. The possibility of training motor and cognitive functions, such as attention, during a therapeutic session, is sure of interest to SM people since they often complain about motor impairments and attention disorders. However, devices specifically designed for that goal are needed. This study, in addition to giving indications for possible use in clinics and at home, sets the basis for future studies where, through more sophisticated technologies, the "game" could be used as a personalized tool for every person with SM.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Baroni A, Fregna G, Milani G, Severini G, Zani G, Basaglia N, Straudi S. Video game therapy on mobility and dual tasking in multiple sclerosis: study protocol for a randomized controlled trial. *BMJ Open*. 2021 Oct 21;11(10): e052005. doi: 10.1136/bmjopen-2021-052005
- Giulia Fregna, Andrea Baroni, Giacomo Severini, Giada Milani, Nino Basaglia, Sofia Straudi. The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial. Congresso Scientifico Annuale FISM 2020, online
- Giada Milani, Andrea Baroni, Giulia Fregna, Nicola Schincaglia, Alberto Simionato, Giulia Zani, Antonella Bergonzoni, Nino Basaglia, Sofia Straudi. Gli effetti psicologici e cognitivi dell'exergaming nel paziente con sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato. Conference of the Italian Society of Physical Medicine and Rehabilitation (SIMFER), Milano, 2021
- Giulia Fregna, Andrea Baroni, Giacomo Severini, Giada Milani, Nino Basaglia, Sofia Straudi. The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial. Congresso Scientifico Annuale FISM 2021, Roma
- Sofia Straudi, Giacomo Severini, Giada Milani, Giulia Fregna, Nicola Schincaglia, Antonella Bergonzoni, Nino Basaglia, Andrea Baroni. The role of video games therapy on balance and cognitive functions in mild to moderate impaired multiple sclerosis patients. A randomized control trial. Congresso Scientifico Annuale FISM 2022, Roma

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 2 anni (prorogato di 18 mesi) e l'ammontare di 40.000 €**

Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 2 years (extended by 18 months) and the amount of € 40,000

# Studio pilota multicentrico singolo cieco per valutare l'attività e l'efficacia dell'ASSISTarmMS (esoscheletro) sulle ADL correlate all'arto superiore in pazienti con sclerosi multipla



## Marco Caimmi

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Sistemi e tecnologie Industriali Intelligenti per il Manifatturiero Avanzato (STIIMA), Milano, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Matteo Malosio, Tito Dinon, Alberto Mora**

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

**Claudio Solaro, Rachele Di Giovanni Erica Grange**, CRRF Mons L Novarese, 13040 Loc. Trompone, Moncrivello (VC), Italia

**Davide Cattaneo, Thomas Bowman, Alessandro Torchio, Rachele Agazzi**, IRCCS Fondazione Don Gnocchi Foundation, Milano, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nella sclerosi multipla (SM) i deficit della funzionalità dell'arto superiore compromettono la capacità di eseguire le attività della vita quotidiana. Mentre molta attenzione è stata dedicata ai problemi dell'arto inferiore e alla ridotta mobilità dei soggetti con SM, i danni all'arto superiore e le conseguenze di questi sono spesso sottovalutati e poco studiati. Diversi studi pilota hanno dimostrato l'effetto positivo dei programmi robotici per la riduzione della compromissione degli arti superiori in questa patologia. In particolare, supportare il peso degli arti superiori durante il loro utilizzo sembra essere un approccio promettente, come dimostrato preliminarmente in un programma di riabilitazione basato sull'uso di un esoscheletro per assistere i soggetti con SM durante l'esecuzione di esercizi in un ambiente virtuale. Lo scopo di questo progetto è quello di verificare se un intervento basato sull'uso di un esoscheletro (ASSISTarmMS) che supporta il peso dell'arto superiore e consente l'esecuzione di movimenti funzionali potrebbe essere utile per un gruppo di soggetti affetti da SM con disabilità severa all'arto superiore. Il programma riabilitativo è composto da 12 sessioni di 45 minuti (3 volte a settimana per 4 settimane). Ad ogni sessione, i soggetti hanno svolto compiti funzionali che coinvolgevano il raggiungimento e la manipolazione di oggetti reali, (ad es. bottiglie, barattoli,

lucchetti, chiavi, piccoli contenitori, pioli, perline, fessure per monete) presi dalle attività tipiche della vita quotidiana e considerando anche compiti bimanuali. Il disegno dello studio ha previsto di quantificare sia l'effetto immediato di ASSISTarmMS (effetto ortesi) sulla funzionalità dell'arto superiore sia l'effetto dell'intervento (effetto training).

## RISULTATI

Nel corso dello studio un gruppo di soggetti con SM sono stati sottoposti a screening per verificare di essere adeguati ai criteri di inclusione. Diciotto di questi sono stati selezionati e hanno partecipato allo studio. Il gruppo era alquanto eterogeneo presentando diversi livelli di disabilità dell'arto superiore, come si è potuto evincere dai risultati delle valutazioni cliniche.

Alla prima valutazione, eseguita con e senza esoscheletro, 8 soggetti che mostravano una buona funzionalità residua dell'arto superiore, non hanno mostrato particolare beneficio nell'uso dell'esoscheletro rispetto alle prove eseguite senza esoscheletro. Questo risultato non è sorprendente perché in soggetti con una buona funzionalità residua dell'arto superiore, i benefici dati dal supporto del peso del braccio possono essere inferiori rispetto alle limitazioni date dall'uso del dispositivo, in particolare considerando i problemi legati alle limitazioni ai movimenti dovute all'ingombro

dell'esoscheletro (tutti gli esoscheletri interferiscono in parte con i movimenti dell'arto su cui vengono applicati).

I restanti 10 soggetti hanno riportato di avere la sensazione di un buon beneficio, in termini di funzionalità, grazie al compenso del peso del braccio fornito dall'esoscheletro ASSISTarmMS. Questa sensazione è supportata dalle valutazioni cliniche effettuate sin dal primo utilizzo dell'esoscheletro. Infatti, questi soggetti hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'affaticamento e un incremento della funzionalità rispetto all'esecuzione degli stessi compiti senza il supporto dell'esoscheletro. In questo gruppo, quindi, l'effetto ortesi è stato evidente.

Di questi 10 soggetti che hanno presentato un vantaggio immediato nell'uso dell'esoscheletro, 7 sono stati sottoposti a quattro settimane di training come da protocollo. Le valutazioni finali eseguite dopo 4 settimane hanno mostrato risultati eterogenei, evidenziando maggiori miglioramenti in soggetti con disabilità più lieve all'arto superiore.

## CONCLUSIONI

I risultati dello studio riportano un duplice effetto di ASSISTarmMS sulle prestazioni dei soggetti selezionati: un effetto immediato, una sorta di effetto ortesi, che consente ai soggetti di svolgere compiti meglio e più a lungo quando utilizzano l'esoscheletro rispetto a quando eseguono gli stessi compiti senza alcuna assistenza; un effetto a medio termine, dovuto al training con l'esoscheletro di quattro settimane, che consente al soggetto di eseguire, anche senza il supporto dell'esoscheletro, i compiti meglio e per un tempo più lungo a fine intervento (effetto training). È interessante che i soggetti SM con maggiore disabilità sembrerebbero giovare maggiormente dell'effetto ortesi mentre, al contrario, sembrerebbero giovare maggiormente dell'effetto training soprattutto i soggetti con una migliore funzionalità residua. Sarà fondamentale tener conto di questi risultati per la futura selezione dei candidati all'uso di ASSISTarmMS.

# A multicenter single-blind pilot study for evaluating the activity and the efficacy of ASSISTarmMS, an exoskeleton, on upper-limb-related ADL in MS patients

## INTRODUCTION AND AIMS

An adequate upper-limb function is essential to interact with the environment. Upper-limb impairments can occur in subjects with Multiple Sclerosis (MS) with different disorders involving hand sensation, strength, tactile sensibility, active range of motion, tremors, and difficulties in inter-joint coordination. These impairments lead to reduced manual dexterity and difficulties in carrying out Activities of Daily Living (ADLs). Nevertheless, much attention has focused on impaired mobility in MS, while upper-limb impairment is understudied (Kraft et al. 2014). Several pilot studies demonstrated the positive effect of robotic programs on upper-limb impairment reduction in MS. Specifically, the effectiveness of upper-limb weight support seems to be promising as preliminary demonstrated in a rehabilitation program based on the use of an exoskeleton to assist participants during the execution of virtual tasks (Gijbels et al. 2011). The aim of this project is to preliminarily verify whether an intervention based on the use of an exoskeleton (ASSISTarmMS), supporting the upper-limb weight and allowing the execution of complex functional movements, could be beneficial on a group of 26 MS subjects with a high level of upper-limb impairment. The rehabilitative program comprises 12 sessions of 45 minutes (3 times a week for 4 weeks). At each session, subjects performed functional tasks involving reaching and mani-

pulating real objects (e.g., bottles, jars, padlocks, keys, small containers, pegs, beads, and coin slots) taken from typical activities of daily living. Bimanual tasks will also be considered. The study was designed to assess a double possible effect of ASSISTarmMS on the selected subjects' performance: an immediate effect, a kind of orthotic assistance (orthotic effect), and a midterm effect due to the intervention with the exoskeleton (training effect).

## RESULTS

During the study, a group of persons with MS was screened for eligibility, and eighteen subjects were included in the study. The group was heterogeneous, presenting different levels of impairment as demonstrated by the clinical assessment.

At the baseline assessment, with and without an exoskeleton, 8 people with MS with high residual function of the upper limb did not present an advantage in using ASSISTarmMS.

This finding is not surprising because in subjects with good residual function, the benefits of arm weight support may be outweighed by the problems related to movement limitations due to the exoskeleton (all exoskeletons interfere to some extent with limb movements).

The other 10 people reported feeling an advantage in upper limb function using the ASSISTarmMS weight sup-

port. In this subgroup, the clinical evaluations carried out at baseline with the exoskeleton showed a statistically significant improvement in terms of fatigue reduction and increased upper limb functionality compared to the execution of the same tasks without the exoskeleton support. Indeed, in this subgroup, the orthotic effect was evident. Out of this subgroup of 10 subjects who presented an advantage at baseline assessment using the ASSISTarmMS, 7 underwent 4 weeks of training as per protocol. Evaluations at 4 weeks (T1) showed heterogeneous results with a trend that seems to indicate greater improvements in less impaired subjects.

## CONCLUSIONS

The main study results report a double possible effect of ASSISTarmMS on the selected subjects' performance:

an immediate effect, a kind of orthotic assistance, which enabled subjects to perform tasks better and for a longer time when using the exoskeleton if compared when performing the same tasks without any assistance; a midterm effect, which is due to the training with the exoskeleton, enabling subjects to perform tasks, better and for a longer time after the four-week intervention as compared to before the intervention even without the ASSISTarmMS support (treatment effect).

It is interesting that participants with greater upper limb impairment would seem to benefit more from the orthotic effect while, on the contrary, participants with higher residual functionality would seem to benefit more from the training effect. It is essential to take these results into account when selecting candidates for the use of ASSISTarmMS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Rachele Agazzi. *Utilizzo di un esoscheletro per il trattamento dell'arto superiore in soggetti con Sclerosi Multipla. Bachelor's thesis. Relatore: Davide Cattaneo, anno accademico 2020/2021, Corso di laurea: Fisioterapia*
- Bowman T, Agazzi R, Carpinella I, Torchio A, Di Giovanni R, Grange E, Dinon T, Malosio M, Cattaneo D, Solaro C, Caimmi M, *The orthotic and rehabilitative effect of an exoskeletal device on upper-limb function and daily living activities in people with Multiple Sclerosis"; in preparation*

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2018 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 29.925 €**  
Research project funded by FISM Grant 2018 for the period of 1 year and the amount of € 29,925

# Depressione e sclerosi multipla: uno studio pilota per esaminare gli effetti della tDCS sull'interazione neurone-glia nel modello EAE



## Marco Cambiaghi

*Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Mario Buffelli, Ilaria Di Iasio**

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

**Gabriela Constantin, Gabriele Angelini, Alessandro Bani**, *Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia*

**Stefano Comai**, *Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nei pazienti con SM la possibilità di sviluppare depressione è da 2 a 5 volte superiore rispetto alla popolazione generale e ai pazienti con altre patologie croniche. I sintomi depressivi sono spesso presenti prima delle disabilità fisiche, indicando che la depressione non è un epifenomeno della malattia, ma ne fa parte. Il modello animale più utilizzato di SM, l'ESA, mostra un comportamento depressivo prima dell'insorgenza clinica, come negli esseri umani. Questo progetto pilota ha lo scopo di analizzare gli effetti di una tecnica neuromodulatoria non invasiva, la stimolazione transcranica con corrente continua (tDCS), sul comportamento depressivo nei topi ESA. La tDCS è in grado di modulare l'eccitabilità neurale agendo sia a livello sinaptico che non sinaptico e la recente letteratura indica che gli effetti a lungo termine della tDCS includono l'immunomodulazione, in condizioni fisiologiche e patologiche, agendo anche sulle cellule gliali.

## RISULTATI

La stimolazione con tDCS anodica (eccitatoria) ha portato ad una modulazione del sistema serotonergico, simile al controllo, mentre la tDCS catodica (inibitoria) non ha avuto alcun effetto sul tono serotonergico. Nonostante la modulazione del sistema serotonergico, i diversi test comportamentali mirati ad analizzare il fenotipo depressivo non hanno portato ad alcun cambiamento significativo. Al contrario, mentre la tDCS anodica non ha avuto

effetti sull'andamento della malattia (se non un peggior score clinico), la stimolazione catodica ha mostrato un trend positivo sui sintomi clinici motori. In merito ai dati sulla neuroinfiammazione e sull'attività dell'interazione neurogliale, al momento abbiamo conservato diversi tessuti e le analisi devono ancora essere svolte. Mentre abbiamo confermato i dati precedenti sulla modulazione del tono serotonergico, non abbiamo ottenuto dati significativi sul comportamento. Di interesse, la stimolazione sembra avere un effetto sull'inizio e la progressione della malattia.

## CONCLUSIONI

I dati preliminari di questo progetto pilota suggeriscono un possibile uso della tDCS nel trattamento dell'SM, nonostante abbiano solo in parte confermato l'ipotesi sperimentale originale sul comportamento depressivo. A breve termine, se confermati, questi dati potrebbero aprire la strada ad un più dettagliato studio degli effetti della tDCS nel modello ESA, per poi, a lungo termine, ipotizzare il suo utilizzo nell'uomo.

# Depression and multiple sclerosis: a pilot study to explore the effects of tDCS on neuro-glia interaction in the EAE model

## INTRODUCTION AND AIMS

In MS patients the possibility to develop depression is two to five-times higher if compared with the general population and patients with other chronic conditions. Depressive symptoms are often present before the presence of physical disabilities, indicating that depression is not an epiphenomenon to the disease, but it is part of it. The most used animal model of MS, the EAE in mice, exhibits a depressive behavior before the clinical onset, as in humans. Here, I propose a Pilot Project to analyze the effects of a non-invasive neuromodulatory technique, namely transcranial direct current stimulation (tDCS), on depressive behavior in EAE mice. tDCS is able to modulate neural excitability acting at both synaptic and non-synaptic levels and recent literature indicates that tDCS aftereffects includes immunomodulation, in physiological and pathological conditions, by acting also on glial cells.

## RESULTS

Stimulation with anodal (excitatory) tDCS led to a modulation of the serotonergic system, similar to control, while cathodal (inhibitory) tDCS had no effect on seroto-

nergic tone. Despite the modulation of the serotonergic system, behavioral tests aimed at analyzing the depressive phenotype did not lead to any significant change. Conversely, while anodal tDCS had no effect on disease progress (except for a worse clinical score), cathodal stimulation showed a positive trend on motor clinical symptoms. Regarding the data on neuroinflammation and neuroglial interaction activity, we have preserved several tissues and the analysis have yet to be performed. While we confirmed previous data on the modulation of serotonergic tone, we did not obtain significant data on behavior. Of interest, stimulation appears to have an effect on disease initiation and progression.

## CONCLUSIONS

Preliminary data from this pilot project suggest a possible use of tDCS in the treatment of MS, although they only partially confirmed the original experimental hypothesis on depressive behavior. In the short term, if confirmed, these data could pave the way for a more detailed study of the effects of tDCS in the EAE model, and then, in the long term, to imagine its use in humans.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Publications

- Cambiaghi M, Cordaro M, Dossena S, Cuzzocrea S and Buffelli M (2023) Editorial: Non-invasive brain stimulation techniques in neurological and neuropsychiatric disorders: Physiological and molecular evidence. *Front. Syst. Neurosci.* 17:1128205. doi: 10.3389/fnsys.2023.1128205

### Congress Presentation

- Poster at the FISM-AISM (Rome, May. 24-26 2022), where all the data obtained up to that time were presented
- Selected symposium at the ICCN (Geneve, Sept. 4-8 2022), where I presented some of the data deriving from the experiments on WT mice
- Invited lecture at the BraYn Conference (Roma, Sept. 28-30 2022), where I presented some of the data deriving from the experiments on WT mice.

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2020 per il periodo di 1 anno (prorogato di 5 mesi) e l'ammontare di 25.650 €**

Research project funded by FISM Grant 2020 for the period of 1 year (extended by 5 months) and the amount of € 25,650



**PROGETTI SPECIALI**  
SPECIAL PROJECTS

---

## Introduzione / Introduction

---

AISM, attraverso la sua Fondazione, sostiene, con le proprie risorse, anche la ricerca dedicata a progetti speciali, che coprono specifiche aree d'interesse e riguardano ricerche di ampio respiro, pluriennali che prevedono la compartecipazione e la collaborazione di diversi centri di eccellenza nazionali e/o internazionali. La distribuzione delle tematiche affrontate da tali progetti evidenzia l'impegno a finanziare e promuovere la ricerca e le infrastrutture per rispondere all'Agenda delle Persone con SM.

Di seguito riportiamo un approfondimento sui principali progetti speciali di ricerca in corso suddivisi in ambiti di studio.

*Through its Foundation, AISM also supports, with its own resources, research dedicated to special projects, which cover specific areas of interest and concern multi-year research involving the participation and collaboration of various national and international centers of excellence. The distribution of the research area addressed by these projects highlights the commitment to finance and promote research and infrastructure to respond to the Agenda for People with MS.*

*The following is an in-depth analysis of the main special research projects in progress divided into research areas of study.*

---

# **Medicina personalizzata**

Personalized  
Medicine

---

# Trasformare la cura della sclerosi multipla in Italia attraverso il PDTA e la Rete della SM. Un'indagine sui Centri clinici



## Tommaso Manacorda

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Giampaolo Bricchetto, Federica Molinari, Jessica Podda, Michela Ponzio**

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

**Michela Ponzio**, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia

**Federica Terzuoli**, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova, Italia

**Piero Lamendola**, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova, Italia

**Daiana Bezzini, Mario Alberto Battaglia**, Università degli Studi di Siena, Siena Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) causa una amplissima varietà di sintomi, che cambiano e si evolvono nel tempo in un quadro generalmente caratterizzato da un progressivo aggravamento delle condizioni. La SM può portare a distanza di anni dalla diagnosi a limitazioni importanti dell'autonomia e a disabilità. Le persone con SM hanno quindi bisogno nel corso della loro vita di molti servizi sanitari e sociali diversi tra loro. Questi spaziano dai consulti con numerosi specialisti diversi dal neurologo (ad esempio urologi, gastroenterologi, ginecologi, etc.) alla terapia riabilitativa e occupazionale, al supporto psicologico, fino ad assistenza personale e domiciliare e ausili, e all'accesso alle misure di protezione sociale e di inclusione sociale e lavorativa.

Un totale di 240 Centri clinici specializzati forniscono diagnosi e cura della SM all'interno del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) italiano. Per lo più con sede nei Dipartimenti di neurologia, i centri sono stati autorizzati a metà degli anni '90 dal SSN a somministrare i primi trattamenti modificanti la malattia (DMT).

Percorsi Diagnostico Terapeutici e Assistenziali (PDTA) sempre più diffusi richiedono ai Centri clinici di coordinare l'assistenza multidisciplinare e di garantire la collaborazione tra ospedali, comunità e assistenza sociale per le persone con SM.

Comprendere se esistano reti locali di servizi guidati da Centri clinici e quali fattori ostacolino o facilitino la loro creazione è fondamentale per progettare politiche volte a sostenere la trasformazione dell'assistenza alla SM.

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM) ha condotto un sondaggio all'inizio del 2022 presso tutti i Centri clinici italiani attraverso un questionario progettato in collaborazione con un Comitato Consultivo che comprende rappresentanti del Ministero della Salute, organizzazioni professionali competenti, accademici e ricercatori.

## RISULTATI

Il 70% dei Centri clinici italiani (n=169) ha completato il questionario e ha riferito di seguire complessivamente 102.246 persone con SM (77% dei casi prevalenti stimati in Italia). Il 25% dei centri partecipanti fornisce assistenza seguendo un PDTA locale, mentre rispettivamente il 44%, l'11% e il 20% ha riportato un PDTA regionale, informale o nessun PDTA. La presenza di un PDTA locale è risultata significativamente associata a una maggiore collaborazione con i servizi di assistenza sociale e di comunità e con la presenza di una rete locale di erogatori, rispetto sia a nessun PDTA che a un PDTA regionale. La carenza di personale e un'infrastruttura tecnologica non ottimale sono i fattori indicati con maggior frequenza come ostacoli all'implementazione del PDTA.

## CONCLUSIONI

La maggior parte dei Centri clinici fatica a costruire relazioni con gli altri erogatori di servizi sanitari coinvolti nella cura della SM sul territorio, in particolare con quelle più lontane dall'ambiente ospedaliero e dal settore sanitario. Reti territoriali di presa in carico per la SM esistono solo in

una minoranza di casi. I PDTA locali sono veicoli efficaci per formalizzare la collaborazione tra ospedali, comunità e for-

nitori di assistenza sociale e per facilitare il ruolo guida dei Centri clinici nella trasformazione dell'assistenza alla SM.

## Transforming multiple sclerosis care in Italy through Integrated Care Pathways and local networks of service providers. A survey on clinical centres

### INTRODUCTION AND AIMS

MS causes a very wide variety of symptoms, that change and evolve over time, often towards a progressive worsening of health conditions. Years after diagnosis, MS can lead to significant limitations of autonomy, and to disability. Therefore, throughout their lives people with MS need a variety of very different health and social care services: from consultations with several specialists other than the neurologist (e.g. urologists, gastroenterologists, gynecologists, etc.) to rehabilitation and occupational therapy, psychological support, up to personal and home assistance and aids, and access to social protection measures and social and work inclusion. A total of 240 specialised clinical centres (CCs) provide diagnosis and treatment of multiple sclerosis (MS) within the Italian National Health System (SSN). Mostly based in neurology departments clinical centres were authorised in the mid '90s by SSN to administer the first Disease Modifying Treatments (DMTs).

Increasingly widespread Integrated Care Pathways (ICPs) require clinical centres to coordinate multidisciplinary care and to ensure collaboration across hospital, community and social care for people with MS (PwMS). Understanding whether clinical centres led local networks of services exist and what factors hinder of facilitate establishing them is key to design policies aimed at supporting transformation of MS care. The Italian MS Society (AISM) carried out a survey in early 2022 inviting all

Italian clinical centres. The questionnaire was designed in collaboration with an advisory board including representatives from the Ministry of Health, relevant professional bodies, academics and researchers.

### RESULTS

The 70% of Italian clinical centres (n=169) completed the questionnaire and reported to follow 102,246 PwMS overall (77% of the estimated prevalent cases in Italy). 25% of participating CCs provide care based on a local ICP while 44%, 11% and 20% respectively mentioned a regional, an informal or no ICP. Presence of a local ICP was significantly associated with more collaboration with community and social care services and with reported existence of a local network of providers, compared both to no ICP and to regional ICP. Staff shortage and suboptimal IT infrastructure are reportedly the main factors hindering transformation.

### CONCLUSIONS

Most CCs struggle to build relationship with other providers, especially with those farther from the hospital setting and the healthcare domain. A minority of CCs reports the existence of networks in MS services. Local ICPs are effective vehicles to formalize collaboration across hospital, community and social care providers, and to facilitate the leading role of CCs' in transforming MS care.



#### **Progetto speciale di ricerca FISM svolto nell'ambito della prima fase del Progetto "PDTA come strumento di umanizzazione e personalizzazione dei percorsi di cura e assistenziali presso la rete della SM".**

FISM Research special project carried out as part of the first phase of the project "PDTA as a tool for humanizing and personalizing care and assistance pathways within the MS network".

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



**Michela Ponzio**

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM, Genova, Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS

Jessica Podda, Andrea Tacchino, Anna Verri

## PREMESSE E OBIETTIVI

Molte persone con sclerosi multipla (SM), soprattutto con disabilità più avanzata, possono richiedere un supporto emotivo, fisico e pratico per gestire le sfide quotidiane e per mantenere l'autonomia. L'assistenza e il supporto ricadono principalmente su un membro della famiglia, identificato come caregiver. Il 30% delle persone con SM a causa della disabilità ha bisogno di un'assistenza continua nelle attività quotidiane, che nell'80% dei casi è fornita dai caregiver familiari. Il ruolo del caregiver è ricoperto in più della metà dei casi dal compagno o compagna e nel 25% dai figli o genitori. La quantità di tempo dedicata all'assistenza e le restrizioni alla vita personale sono fattori che aumentano il "peso" psicologico, sociale, fisico ed economico del caregiver.

Gli obiettivi dello studio sono di valutare la percezione di competenza delle persone che si prendono cura o assistono un familiare con SM e di identificare i fattori che possono modificare la loro percezione. Lo studio sarà condotto in tre fasi. La prima fase consisterà nello sviluppo e la validazione della scala Caregiver MS Knowledge (CareKoMS) Questionnaire in un campione di caregiver di persone con SM. La seconda fase prevedrà una validazione culturale della scala Sense of Competence Questionnaire (CareSOC) in lingua italiana. La terza fase dello studio valuterà la percezione di competenza dei caregiver di un familiare con SM utilizzando la nuova versione italiana del questionario validato in fase 2. Inoltre, la terza fase analizzerà i potenziali fattori che possono modificare la percezione di competenza, tra cui la conoscenza delle SM da parte dei caregiver (validata nella fase 1), il coping, il supporto sociale, la qualità della vita, l'umore, le caratteristiche sociodemografiche e gli aspetti relativi alla persona con SM.

## RISULTATI

La prima fase dello studio ha riguardato sviluppo e validazione della Scala CareKoMS.

- *Sviluppo dello strumento.* Inizialmente, un pool di 52 item a risposta multipla sono stati individuati ad opera di un panel multidisciplinare di esperti che includeva psicologi, fisioterapisti, neurologi, fisiatra, personale di AISM vicino a pazienti e caregiver, basato sull'esistente letteratura e sulle informazioni a disposizione di AISM con l'obiettivo di investigare la conoscenza che i caregiver avessero sulla malattia del loro familiare con SM. Successivamente, il panel di esperti ha realizzato una versione a 32 item sulla base di una loro revisione e dei feedback ottenuti a seguito di due focus group condotti con alcuni caregiver di persone con SM.

- *Valutazione psicometrica dello strumento.* I 32 item di cui era composta la versione preliminare dello strumento ricoprivano i 6 ambiti più rilevanti della SM (eziopatogenesi, incidenza, diagnosi, decorso, sintomi, terapia). 200 caregiver reclutati da psicologi esperti in SM appartenenti al network italiano "Rete Psicologi AISM" ha risposto alla versione a 32 item della scala per eliminare gli item con scarse proprietà psicometriche. L'analisi è stata condotta utilizzando alcuni indicatori come indice di difficoltà degli item, indice di discriminazione degli item, il coefficiente di Kuder-Richardson-20 e la correlazione item-totale. Sulla base dei risultati ottenuti, 11 item sono stati eliminati ottenendo quindi una versione finale a 21 item. Il punteggio medio della scala è di 13.7 (DS± 3.7); il valore mediano di 14 (RIQ: 11-16), non si registra né un effetto tetto né un effetto pavimento. La distribuzione dei punteggi è risultata asimmetrica e l'ipotesi di assunzione di normalità quindi respinta ( $p=0.042$ ). La consistenza interna della scala 21 item è buona (Kuder-Richardson-20: 0.74). La validità di costrutto, analizzata con la tecnica dei gruppi noti, ha evidenziato che i caregiver con un livello più elevato di istruzione avevano punteggi significativamente più elevati rispetto a quelli con un livello di istruzione inferiore ( $p=0.006$ ) mentre il sesso ( $p=0.422$ ) e l'età ( $p=0.818$ ) non risultavano associati alla performance alla scala.

La seconda fase dello studio, ha riguardato lo sviluppo e la

validazione della scala CareSOC. Anche in questo caso, una prima parte ha previsto lo sviluppo del nuovo strumento partendo da una scala già presente in letteratura sviluppata per i caregiver di persone con demenza e qui integrata e adattata al nuovo target (caregivers di persone con SM). È stato identificato, da parte di un gruppo di esperti, un pool iniziale di 27 item che sono stati poi proposti ad un gruppo di persone con SM per valutarne il livello di comprensione. Successivamente sono state implementate le analisi per la valutazione psicometrica dello strumento. L'analisi ha portato ad una versione finale della scala composta da 14 item in grado di misurare 4 aspetti correlati al senso di competenza: il benessere psicologico, l'impatto sulla vita sociale, l'efficacia e la soddisfazione delle cure prestate. La versione finale della scala è risultata avere una buona consistenza interna (alfa di Cronbach=0.81) e una buona affidabilità (test-retest, ICC=0.88).

L'ultima fase del progetto ha analizzato i potenziali fattori che possono modificare la percezione di competenza. L'analisi univariata ha evidenziato un'associazione negativa (peggior senso di competenza) per la presenza di comorbidità ( $\beta=-3.37$ ,  $p=0.004$ ), di ansia ( $\beta=-0.97$ ,  $p<0.001$ ) e depressione ( $\beta=-1.03$ ,  $p<0.001$ ), se si utilizza come strategia di coping la negazione ( $\beta=-0.72$ ,  $p=0.013$ ), se si è un genitore o un figlio ( $\beta=-3.21$ ,  $p=0.032$ ), rispetto ad essere il partner a doversi prendersi cura di una persona con una forma progressiva di SM ( $\beta=-3.45$ ,  $p=0.020$ ) e con elevato livello di disabilità

( $\beta=-1.27$ ,  $p=0.001$ ). Il senso di competenza risulta associato positivamente (miglior senso di competenza) in presenza di supporto familiare ( $\beta=0.38$ ,  $p=0.001$ ) e per alcune strategie di coping come "problem focus" ( $\beta=0.51$ ,  $p=0.016$ ) e atteggiamento positivo ( $\beta=0.50$ ,  $p=0.004$ ).

## CONCLUSIONI

La prima fase dello studio ha realizzato una versione a 21 item della scala CareKoMS. Nel complesso, la scala risulta avere buone proprietà psicometriche e può essere considerata un prezioso strumento in ambito clinico e di ricerca per indagare la conoscenza che i caregiver di pazienti con SM hanno nei confronti di questa malattia neurodegenerativa. Anche la scala CareSOC sembra essere uno strumento importante per studiare una serie di aspetti che possono essere identificati e conseguentemente modificati in ottica di migliorare la qualità della vita del caregiver. Infine una prima analisi sui potenziali determinanti del senso di competenza ha evidenziato come la salute fisica e mentale del caregiver sia una componente importante che impatta negativamente sulla loro percezione di essere all'altezza del ruolo che devono svolgere, così come il fattore 'generazionale' sembra essere di ostacolo nello svolgere il ruolo. Le risorse personali (strategie di coping) e 'ambientali' (supporto della famiglia) sono uno strumento importante per gestire al meglio le situazioni con l'obiettivo di non sentirsi sopraffatti.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Many people with Multiple Sclerosis (pwMS), especially those individuals with moderate to severe disability, require emotional, physical and practical support to manage the challenges of daily life and to maintain independence. Providing this on-going support falls primarily on family members, often referred to as caregivers, who provide as much as 80% of home care to individuals with MS.

Distinctive characteristics of MS can influence the caregiving experience, including the fact that the onset is most often in young adulthood, it is a degenerative illness, there is currently no definitive cure, the disease course is variable, acute exacerbations can occur unpredictably and clinical symptoms vary.

The overall aim of the study is to evaluate the sense of competence in family caregivers of pwMS and to determine potentially influencing factors. The study will be carried out in three steps.

The first step will consist of the development and validation of the Caregiver MS Knowledge (CareKoMS) Questionnaire

in a sample of caregivers of pwMS in order to investigate caregivers' knowledge about MS. In the second step, there will be a cross-cultural validation of the family caregiver Sense of Competence Questionnaire (CareSOC) into Italian. The third step of the study will assess the sense of competence of family caregivers of individuals with MS. The final phase will assess potential correlating factors including caregivers' knowledge of MS (validated in phase 1), coping, perceived social support, quality of life, mood, sociodemographic variables and care recipient characteristics.

## RESULTS

The first step that consists of the development and validation of the CareKoMS Questionnaire. This step was based on two different phases: instrument development and psychometric evaluation.

*Instrument development.* A bank of 52 multiple-choice questions was developed by an expert multidisciplinary panel including psychologists, physical therapists, neurologists, rehabilitation physicians, MS Society staff expert in patient

and family information based on available literature and caregiver-targeted information materials produced by the MS Society, with the goal of testing caregivers' knowledge of the disease. Subsequently, a preliminary version of instrument of 32 items has been produced by the expert panel considering results of two caregiver's focus groups.

**Psychometric evaluation.** A preliminary version of 32-item instrument was developed, reflecting 6 themes expressing the most relevant aspects of knowledge of MS based on multi-disciplinary expert panel. The original 32 items instrument was tested on 200 caregivers enrolled through a national network of psychologists working on MS named "Rete Psicologi AISM" to eliminate poor performing items. The item analysis using item difficulty index, item discrimination index, Kuder-Richardson-20 coefficient and the item-total correlation were assessed. Based on these results, 11 items were removed obtaining a final version of 21-items. The mean 21-items CareKoMS was 13.7 (SD: 3.7), median 14 (IQR: 11-16), no ceiling or floor effects were registered. Score distribution was skewed, and the normality assumption rejected ( $p=0.042$ ). The internal consistency of the 21 items was good (Kuder-Richardson-20, 0.74). Finally, construct validity was analysed using known groups technique. Group scores of participants with a high educational level were found to be statistically significantly higher than caregivers with lower educational level ( $p=0.006$ ), while sex ( $p=0.422$ ) and age class ( $p=0.818$ ) were not associated with C-MSKQ score.

The second step of the study consists of the development and validation of a scale on the caregiver's sense of competence (CareSOC). The first phase consisted in the development of the new tool starting from a scale already present in the literature created for caregivers of people with dementia and here integrated and adapted to the new target population (caregivers of pwMS). An initial pool of 27 items was identified by a group of experts and then submitted to a group of people with MS to assess their level of understanding. In the second phase, the psychometric evaluation of

the instrument were implemented. The final version of the C-SOC included 14 items was thus defined, covering a range of aspects related to sense of competence such as psychological well-being, social life impact, care efficacy and care satisfaction. C-SOC showed a good internal consistency (Cronbach's  $\alpha=0.81$ ) and good reliability (test-retest,  $ICC=0.88$ ).

The final phase of the project assessed potential correlating factors of sense of competence including caregivers' knowledge of MS, coping, perceived social support, quality of life, mood, sociodemographic variables and care recipient characteristics.

In the univariate analysis, the CareSOC was negative associated to caregiver characteristics as presence of comorbidity ( $\beta=-3.37$ ,  $p=0.004$ ) and anxiety ( $\beta=-3.37$ ,  $p<0.001$ ) and depression ( $\beta=-1.03$ ,  $p<0.001$ ), to denial coping strategy ( $\beta=-0.72$ ,  $p=0.013$ ), to be a parent or son respect to be partner ( $\beta=-3.21$ ,  $p=0.032$ ), and to care recipients variables as progressive form (SP/PP) respect to RR course ( $\beta=-3.45$ ,  $p=0.020$ ) and to disability level ( $\beta=-1.27$ ,  $p=0.001$ ). CareSOC was positive related to family support ( $\beta=0.38$ ,  $p=0.001$ ) and other coping strategies as problem focus ( $\beta=0.51$ ,  $p=0.016$ ) and positive attitude ( $\beta=0.50$ ,  $p=0.004$ ).

## CONCLUSIONS

The project made it possible to develop two new specific tools: CareKoMS a scale useful to investigate caregivers' knowledge about MS and CareSOC to measure the sense of competence of caregivers of pwMS.

The potential determinants of the sense of competence has highlighted how the physical and mental health of the caregiver is an important component that negatively impacts their perception of being up to the role they have to play, just as the 'generational' factor seems to be a hindrance in fulfilling the role. Personal resources (coping strategies) and environmental resources (family support) are an important tool to better manage situations with the aim of not feeling overwhelmed.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- M. Ponzio, A. Tacchino, G. Bricchetto, A. Verri, M.A. Battaglia, J. Podda. *Caring for the carer of people with multiple sclerosis. 38th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) 26 - 28 October 2022, Amsterdam, the Netherlands.*
- Podda J, Tacchino A, Verri A, Battaglia MA, Bricchetto G, Ponzio M. *Development and validation of a self-assessed knowledge questionnaire for caregivers of people with Multiple Sclerosis: CareKoMS. Submitted to BMJ open*

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 e l'ammontare di 30.000 €**  
FISM Research special project funded in 2020 and the amount of € 30,000

# MyMood: sviluppo di nuovi patient-reported outcomes sui disturbi dell'umore nella SM. Un approccio di co-creazione tramite scienza basata sull'input del e con il paziente



## Federico Bozzoli, Ludovico Pedullà

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM, Genova, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Giampaolo Brichetto, Federica Molinari, Jessica Podda, Michela Ponzio**

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

**Paolo Confalonieri**, Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

**Monica Falautano**, Università Vita Salute H. San Raffaele, Milano, Italia

**David Korn**, Fondazione Policlinico Universitario Gemelli IRCCS, Roma, Italia

**Guendalina Graffigna**, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'umore è una personale disposizione dell'animo, in grado di determinare particolari reazioni emotive che possono essere più o meno stabili. Talvolta però questi cambiamenti e alterazioni possono diventare veri e propri disturbi dell'umore, che condizionano la vita di chi ne è soggetto. I disturbi dell'umore sono comuni nella sclerosi multipla (SM), ma gli strumenti di valutazione esistenti non sono sempre focalizzati su questioni importanti per le persone con SM. La scienza basata sull'input del e con il paziente suggerisce l'importanza del loro coinvolgimento come co-ricercatori a tutti i livelli del percorso di ricerca, condividendo con altri stakeholder la propria esperienza della malattia, che si traduce in una forma di conoscenza che si integra con la conoscenza scientifica (es. conoscenza esperienziale).

Negli ultimi anni, grande interesse è stato dato ai Patient Reported Outcomes (PRO) nella SM, definiti come strumenti scientifici che riflettono la prospettiva e l'esperienza delle persone con SM in relazione al loro trattamento o condizione di malattia, dando valore e qualità all'informazione che viene dalle persone stesse. Inoltre, diverse iniziative recenti, ad esempio il progetto MULTI-ACT, promuovono una partecipazione informata e di qualità delle persone con SM nei processi decisionali della ricerca e dell'assistenza sanitaria in merito al loro trattamento e alle loro prestazioni.

Gli obiettivi del presente studio sono: (i) definire e testare un modello operativo per la co-creazione di nuovi PRO

basati sulla scienza e con l'input del paziente; (ii) sviluppare un nuovo questionario su ansia e depressione basato sul modello sopra menzionato per caratterizzare meglio i disturbi dell'umore nelle persone con SM.

## RISULTATI

Il progetto MyMood è stato disegnato seguendo le linee guida MULTI-ACT, a partire dalla costituzione di un Team di Coordinamento (Engagement Coordination Team, ECT), responsabile della gestione del coinvolgimento degli stakeholder e composto da una persona con SM in un ruolo chiave, un caregiver, ricercatori, un esperto di MULTI-ACT, medici, psicologi e un metodologo.

Successivamente è stata condotta un'analisi della letteratura sulla base della prospettiva di un gruppo di pazienti coinvolti tramite la compilazione di un diario sullo stato dell'umore. Sono stati identificati i seguenti domini legati alla regolazione dell'umore: equilibrio emotivo instabile, sovraccarico emotivo, scarsa auto-efficacia, mancanza di comprensione, autoisolamento, senso di colpa, mancanza di speranza, e non accettazione; e i seguenti meccanismi di resilienza: flessibilità, hardiness, ottimismo, cura di sé, consapevolezza e accettazione.

Sulla base delle scale esistenti sugli aspetti individuati e del materiale raccolto sono stati generati gli item del nuovo questionario (N>200). Un panel di esperti ha ridotto la prima bozza del questionario, eliminando elementi ridondanti o che coinvolgessero domini diversi da quello indagato, come le funzioni cognitive o motorie. Inoltre,

ai membri del panel è stato chiesto di valutare gli elementi dello strumento in termini di pertinenza per il costrutto sottostante lo studio secondo le definizioni teoriche del costrutto stesso e delle sue dimensioni su una scala ordinale a 4 punti (da 1=non rilevante a 4=molto rilevante). L'indice di validità dei contenuti per la rilevanza di ciascun item (I-CVI) è stato ottenuto dividendo il numero di coloro che hanno giudicato l'item rilevante (rating 3 o 4) per il numero degli esperti: se l'I-CVI era superiore al 79%, il l'item è stato ritenuto appropriato; se era tra il 70-79%, doveva essere rivisto; se era inferiore al 70%, veniva eliminato. Infine, è stata studiata se lo strumento ha validità per gli utenti finali, ossia le persone con SM (PcSM). A questo scopo, è stato chiesto a 30 PcSM, a cui è stato introdotto dettagliatamente il processo di co-creazione del questionario, di identificare gli item che ritenevano fossero i più importanti per loro e di valutarne l'importanza su una scala Likert a 5 punti da 'Non importante' a 'Molto importante'. Sono stati misurate la percentuale di PcSM che hanno dato un punteggio di 4 o 5 (frequenza) e il punteggio medio di importanza di ciascun elemento (importanza) ed è stato calcolato il punteggio di impatto degli item con la seguente formula: Item Impact Score (IIS) = frequenza × Importanza. Gli item sono stati mantenuti per IIS ≥ 1,5, corrispondenti

a una frequenza media del 50% e una ad una importanza media di 3 sulla scala Likert a 5 punti. I rimanenti item sono stati ridiscussi dall'ECT in modo da eliminare eventuali ridondanze, modificare gli ultimi aspetti poco chiari e redigere la versione finale del questionario.

## CONCLUSIONI

Il processo di coinvolgimento (diari, focus group e interviste) ha confermato l'importanza di indagare la regolazione dell'umore nella SM e, allo stesso tempo, valutare i meccanismi di resilienza messi in atto dalle PcSM per affrontare i problemi legati allo stato dell'umore. Un nuovo PRO su umore e resilienza è stata co-creata dalle PcSM per le PcSM, consentendo di includere domini rilevanti nel questionario seguendo un processo scientifico (le linee guida MULTI-ACT). Le espressioni lessicali sono state sviluppate e convalidate dalle PwMS, in collaborazione con clinici esperti, ricercatori e caregivers al fine di massimizzare la chiarezza, soddisfare le aspettative degli utenti e aumentare l'aderenza futura.

Saranno necessarie ulteriori ricerche per valutare le proprietà psicometriche del nuovo questionario con analisi statistiche appropriate.

# MyMood: developing new patient-reported outcomes on mood disorders in MS. An approach of co-creation through science of and with patient input

## INTRODUCTION AND AIMS

Mood is a conscious state of mind or predominant emotion that can be more or less stable. However, sometimes these changes and alterations can become real mood disorders, which affect the life of those who are subject to them.

Mood disorders are common in multiple sclerosis (MS), but existing assessment tools on this domain are not always focused on issues that matter to people with MS (PwMS). The science of and with patient input suggests their engagement as co-researchers at every levels of the research path, sharing with other stakeholders their own experience of the disease, which translates into a form of knowledge that integrates with scientific knowledge (i.e., experiential knowledge).

In the last years, great interest has been given to the patient reported outcomes (PROs) in MS, defined as scientific tools that reflect the perspective and experience of PwMS in relation to their disease condition. Moreover, different recent initiatives, e.g., the MULTI-ACT project,

promote an informed and quality participation of PwMS in the decision-making processes of research and healthcare regarding their treatment and performance.

Aims of the present study are: (i) to define and test an operational model for co-creation of new PROs based on science of and with patient input; (ii) to develop a new questionnaire on anxiety and depression based on the above mentioned model to better characterize mood disorders in people with MS.

## RESULTS

The project MyMood has been implemented following MULTI-ACT guidelines, from the constitution of an Engagement Coordination Team (ECT), a body in charge of the management of stakeholder engagement. MyMood ECT included a person with MS in a key role, a caregiver, researchers, an expert in MULTI-ACT, clinicians, psychologists and a methodologist.

Further, a landscape analysis has been conducted taking

into consideration the input of a group of PwMS who filled in a diary in mood status. The following domains related to mood regulation have been identified: instable mood balance, mood overload, low self-efficacy, lack of understanding, self-isolation, sense of guilt, lack of hope, and non-acceptance; and the following related to resilience mechanisms: flexibility, hardiness, optimism, self-care, awareness and acceptance. On the bases of the existing scales on the identified aspects and the material collected, the item generation process has been conducted, producing more than 200 items. A panel of experts reduced the first draft of the questionnaire, eliminating redundant items or those involving different domains such as cognitive or motor functions. Moreover, panel members were asked to rate instrument items in terms of relevancy to the construct underlying study as per the theoretical definitions of the construct itself and its dimensions on a 4-point ordinal scale (from 1=not relevant to 4=highly relevant). Content validity index for relevancy of each item (I-CVIs) was obtained by dividing the number of those judging the item as relevant (rating 3 or 4) by the number of experts: if the I-CVI was higher than 79%, the item was considered appropriate; if it was between 70-79%, it needed revision; if it was less than 70%, it was eliminated.

Finally, face validity has been investigated to assess whether the instrument has validity for end-users, namely PwMS. To this purpose, 30 PwMS instructed on the whole co-creation process were asked to identify the items they thought are the most important for them, and grade their importance on a 5-point Likert scale from 'Unimportant'

to 'Very important'. The percentage of PwMS who scored 4 or 5 (frequency), and the mean importance score of each item (importance) were calculated and the item impact score of instrument items was computed by the following formula: Item Impact Score (IIS) = frequency × Importance. Items were maintained for IIS ≥ 1.5, corresponding to a mean frequency of 50% and an importance mean of 3 on the 5-point Likert scale. The other items have been further discussed by the ECT in order to remove remaining redundancy, modify last unclear aspects and finalize the version of the questionnaire.

## CONCLUSIONS

The engagement process (including diaries, focus groups and interviews) corroborated the importance to investigate mood regulation in MS and, at the same time, evaluate the resilience mechanisms put in place by PwMS to face the issues related to mood status. A new PRO on mood and resilience has been co-created by PwMS for PwMS, allowing to include relevant domains in the questionnaire following a scientific process (i.e., the MULTI-ACT guidelines). The lexical expressions have been developed and validated by PwMS, in collaboration with expert clinicians, researchers and caregivers in order to maximize clarity, meet the end-users' expectations, and increase future adherence.

Further research will be required to assess the psychometric properties of the new questionnaire with appropriate statistical analyses.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pedullà L, Bozzoli F, Molinari F, Podda J, Falautano M, Confalonieri P, Korn D, Battaglia MA, Grafigna G, Ponzio M, Bricchetto G, Zaratini P. How to measure the impact of mood on people with MS' daily life? A multi-stakeholder approach to co-create a new patient reported outcome. RIMS 2021, virtual edition. Contribution received the Best Platform Presentation Award
- Pedullà L, Bozzoli F, Molinari F, Podda J, Falautano M, Confalonieri P, Korn D, Battaglia MA, Ponzio M, Bricchetto G, Zaratini P. Co-creating new patient-reported outcomes through the science with and of patient input: characterization of mood status in people with multiple sclerosis. ECTRIMS 2021, virtual edition
- Pedulla L, Bozzoli F. Science of Patient Input in Progressive MS. Measuring impact on outcome that matter to patients. FISM Annual Congress 2020

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 60.000 €**  
FISM Research special project funded in 2019 and the amount of € 60,000

# Allestimento italiano del programma “REsilience and Activity every DaY for MS”, degli outcomes, e valutazione pilota di efficacia mediante impiego di metodologia mista (READY- It-MS)



## Ambra Mara Giovannetti

Unità di Neuroepidemiologia, Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia  
School of Psychology, Faculty of Health and Behavioural Sciences, University of Queensland, Brisbane QLD, Australia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Alessandra Solari, Andrea Giordano**, Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

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

**Milda Cerniauskaite**, Dipartimento Gestionale di Ricerca e Sviluppo Clinico, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

**Kenneth Pakenham**, School of Psychology, Faculty of Health and Behavioural Sciences, University of Queensland, Brisbane QLD, Australia

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

**Irene Tramacere**, Dipartimento di Ricerca e Sviluppo Clinico, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

**Michele Messmer Uccelli**, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova, Italia

### COLLABORATORI STUDIO MULTICENTRICO READY/ READY MULTICENTER STUDY COLLABORATORS

#### Multi\_READY for MS Trial Steering Committee

**Ambra Mara Giovannetti, Alessandra Solari, Kenneth Ian Pakenham, Giovambattista Presti**, Kore University Behavioral Lab, Università Kore di Enna, Italia

**Paola Kruger**, Patient Expert, Accademia EUPATI, European Patients Academy for Therapeutic Innovation, Roma, Italia

#### Independent Data and Safety Monitoring Committee

**Stefan Gold**, Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany; Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany

**Marta Bassi**, Department of Biomedical and Clinical Sciences L. Sacco, Università degli studi di Milano, Milano, Italia

**Maria Pia Sormani**, Biostatistics Unit, Department of Health Sciences, University degli Studi di Genova, Genova, Italia



#### *Data Management and Analysis Committee*

**Massimo Copetti, Unit of Biostatistics, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italia**

**Andrea Giordano, Ambra Mara Giovannetti, Alessandra Solari**

#### *Clinical Psychology Expert Panel*

**Ambra Mara Giovannetti, Kenneth Ian Pakenham, Giovambattista Presti, Jana Pöttgen, Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose (INIMS), Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany**

**Simone Napolitano, "Qui e Ora" – Centro per la promozione del benessere psicologico, Milano, Italia**

#### *Centri partecipanti/ Participating centres*

*Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unit of Neuroimmunology and Neuromuscular Diseases, Multiple Sclerosis Centre:*

**Paolo Confalonieri, Rui Quintas, Milda Černiauskaitė**

*San Camillo-Forlanini Hospital, Roma:*

**Carla Tortorella, Maria Esmeralda Quartuccio, Ilaria Rossi**

*AIMS Rehabilitation Service of Genoa, Italian Multiple Sclerosis Society, Genova:*

**Giampaolo Brichetto, Miranda Giuntoli, Annalisa Garaventa**

*Laboratorio di neuropsicologia, UOSD psicologia clinica e UOC neurologia, ASST Lariana:*

**Monica Grobberio, Samuela Turati**

*Centro Sclerosi Multipla, Divisione di Neurologia Generale, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino di Pavia:*

**Roberto Bergamaschi, Eleonora Tavazzi, Ambrogia Ornella Riolo, Marta Picascia**

*Dipartimento Riabilitazione ASL Umbria2:*

**Mary Micheli, Serena De Bigontina**

*Centro Malattie Demielinizzanti e Laboratori di Neurologia Sperimentale, Clinica Neurologica, Università di Perugia:*

**Massimiliano Di Filippo, Elena Di Sabatino, Giuliana Costantini, Eleonora Maltempi**

## **PREMESSE E OBIETTIVI**

Il processo di adattamento alla sclerosi multipla (MS) può essere impegnativo e la malattia può rappresentare un'importante fonte di stress. La resilienza è una risorsa interna che ci permette di alleviare gli effetti avversi dello stress e mantenere un buon livello di salute mentale mentre affrontiamo le avversità. Interventi in grado di rinforzare la resilienza in persone con SM sono quindi fondamentali.

Pakenham e colleghi, Università del Queensland, hanno creato un breve intervento di gruppo per promuovere la resilienza, The REsilience and Activities for every DaY (READY), e sviluppato una versione specifica per persone con SM (READY for MS). Il programma si basa sull'Acceptance and Commitment Therapy (ACT) e ha dato prova di essere efficace nel migliorare il funzionamento psicologico in persone con SM. Purtroppo, è raro che interventi psicologici scientificamente supportati siano adeguatamente disseminati e integrati nei servizi nel lungo termine. Un modo per contrastare questa tendenza è quello di formare al loro utilizzo gli operatori dislocati nei servizi territoriali, con la potenzialità non soltanto di arricchire le loro competenze professionali, ma anche di promuovere il loro benessere. Il progetto REA-

DY-It-MS valuta l'efficacia del programma READY for MS in Italia (Studio 1 e 3, 4) e l'effetto del training sugli operatori (Studio 2).

## **RISULTATI**

Lo Studio 1 è uno studio pilota randomizzato controllato che valuta la fattibilità e l'efficacia della versione Italiana del programma READY for MS, confrontandolo con un intervento di controllo attivo (rilassamento). Trentasette persone con SM sono state assegnate casualmente a uno dei due interventi (1:1 ratio). La maggior parte dei partecipanti (indipendentemente dal tipo di intervento a cui sono stati assegnati) hanno riportato miglioramenti significativi ( $p < 0.01$ ) nella qualità di vita (QoL), nel tono dell'umore, nella resilienza e nella flessibilità psicologica. Il 65% ha avuto un miglioramento clinicamente rilevante nella QoL a tre mesi dalla fine del programma.

La maggior parte dei partecipanti ha mostrato un ottimo livello di coinvolgimento e aderenza al programma. Tutti i partecipanti hanno dichiarato che il programma READY for MS ha migliorato la loro resilienza, avuto un effetto positivo sulla loro vita, permesso loro di affrontare meglio la SM. Tutti i partecipanti raccomanderebbero il programma READY for MS

a altre persone con SM, alcuni suggeriscono di estenderlo a altre condizioni di salute e ai familiari.

A livello quantitativo però, il programma READY for MS non è risultato più efficace del rilassamento. Questo risultato è in contrasto con i dati qualitativi che dimostrano la sua superiorità rispetto al rilassamento per l'impatto sulla vita 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 è uno studio longitudinale con un singolo intervento, che valuta l'effectiveness di un training per formare gli psicologi della rete AISM alla conduzione di gruppi READY for MS. Il training comprende tre fasi: 1) un workshop; 2) la partecipazione a un gruppo READY; 3) la conduzione di un gruppo READY con persone con SM. Le valutazioni sono state effettuate prima del training, prima della partecipazione al gruppo READY, immediatamente dopo e a 3 e 15 mesi dalla fine del gruppo READY rivolto agli psicologi. Quarantaquattro psicologi hanno partecipato e completato con successo le prime due fasi del training, 40 hanno condotto il gruppo con persone con SM. I partecipanti hanno riportato miglioramenti in tutte le misure di esito: resilienza, benessere, tono dell'umore e flessibilità psicologica ( $p < 0.001$ ). I miglioramenti sono emersi subito dopo la partecipazione al gruppo READY a loro dedicato e si sono mantenuti a tre e a 15 mesi dalla fine del gruppo. La flessibilità psicologica media questi miglioramenti. Tutti i partecipanti hanno superato con successo l'esame sulle competenze e si sono detti estremamente soddisfatti dell'esperienza.

Lo Studio 3 valuta l'effectiveness del programma READY for MS quando condotto nei normali servizi territoriali (sezione AISM o Centro SM). Le persone con SM che hanno preso parte al gruppo hanno compilato un set di questionari al basale, subito dopo l'intervento e a tre mesi. Sono stati condotti 33 gruppi (237 partecipanti). I partecipanti hanno mostrato miglioramenti significativi nel livello di resilienza (outcome primario), ansia, depressione, stress, QoL e flessibilità psicologica. I miglioramenti sono avvenuti principalmente immediatamente al termine del gruppo READY e si sono

mantenuti a 3 mesi, indipendentemente da caratteristiche demografiche o di malattia. La flessibilità psicologica è risultata mediare i miglioramenti in tutte le variabili di outcome. I dati qualitativi hanno confermato la fattibilità dell'intervento e l'efficacia del programma.

I risultati dei tre precedenti studi sono stati discussi in due riunioni dedicate (Gennaio 2020), le riflessioni emerse hanno contribuito alla definizione del protocollo dello studio multicentrico randomizzato controllato (Studio 4). Lo studio è attualmente in corso e si concluderà alla fine del 2023. Ad oggi sono stati avviati 10 gruppi per un totale di 190 partecipanti.

## CONCLUSIONI

Il programma READY for MS è stato in grado di migliorare resilienza, ansia, depressione, stress e flessibilità psicologica nei partecipanti, indipendentemente da caratteristiche demografiche o di malattia dei partecipanti. Questo risultato è particolarmente prezioso perché evidenzia come il programma sia estremamente inclusivo e di facile implementazione. A riprova di questo i risultati dello studio 2 e 3 mostrano come il programma READY for MS sia facilmente implementabile nei servizi territoriali italiani dedicati alle persone con SM, indipendentemente dall'area geografica o dalla grandezza del centro/sezione AISM. Inoltre, i risultati dello Studio 2 suggeriscono che il training rivolto agli psicologi abbia avuto un impatto positivo, sia a livello professionale che personale con un mantenimento dei benefici a lungo termine. Lo studio multicentrico in corso chiarirà definitivamente se, come indicato dai dati qualitativi dello studio pilota (studio 1) il programma READY for MS sia superiore a altri interventi standard come il training autogeno.

In conclusione questo progetto ha permesso di testare l'efficacia e "effectiveness" del programma READY for MS, di formare decine di colleghi nella conduzione di questi gruppi e di offrire altrettanti gruppi READY for MS a persone con SM seguite nei centri SM o sezioni AISM in Italia, rivelandosi un programma efficace e inclusivo. AISM ha anche firmato un accordo con l'Università del Queensland per offrire questi gruppi alle persone con SM afferenti alle proprie sezioni.

# Italian set up of the program "REsilience and Activity every DaY for MS", of outcomes, and pilot assessment of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)

## INTRODUCTION AND AIMS

Adjusting to multiple sclerosis (MS) can be highly demanding, and the disease can be a consistent source of stress. Resilience is an internal resource for alleviating the adverse effects of stress and sustaining good mental health through adversity. Therefore, targeted interventions ai-

med at fostering resilience are crucial in helping people with MS deal with their illness-related stressors and improve their quality of life (QoL).

Pakenham and colleagues -University of Queensland- developed a brief resilience group intervention called "The REsilience and Activities for every DaY" (READY) and they

adapted it to people with MS (READY for MS). READY is an Acceptance and Commitment (ACT)-based group intervention able to improve resilience, QoL, depression, stress and psychological flexibility in people with MS.

Unfortunately, empirically supported psychological interventions are often not adequately disseminated and are seldom integrated into frontline services in the longer term. One way to optimize the uptake of such interventions is to train relevant health professionals in their delivery, with also personal benefits for the trainees (e.g. increased psychological flexibility).

The READY-It-MS project consists of four studies, which address two broad aims: 1. to evaluate READY for MS in Italy (Studies 1, 3 and 4); 2. To evaluate a READY for MS health practitioner training program (Study 2).

## RESULTS

Study 1 was a pilot randomized controlled trial to assess Italian READY for MS efficacy when compared to an active control intervention (group relaxation). Thirty-seven people with MS participated and were randomly allocated to READY for MS or control intervention (1:1 ratio). The whole sample reported significant improvements in several psychological dimensions (QoL, mood, resilience, psychological flexibility,  $p < 0.01$ ) three months after program completion, with 65% reaching a clinically significant improvement in the mental component of QoL (primary outcome).

READY was well accepted by MS patients with varied socio-demographic and clinical characteristics. All READY for MS participants stated that it increased their resilience and positively affected their life, and the majority declared it helped them in dealing better with MS. All participants said that they would recommend the READY for MS program to others with MS, and some suggested it should be offered to people with other medical conditions and carers.

However, READY for MS did not result more efficacious than relaxation at a quantitative level but this was a pilot study, with only the power to detect large differences. Instead, qualitative data provided evidence in favour of READY for MS which was considered more engaging and superior to relaxation in terms of impact on daily life and variety of strategies provided.

Study 2 is a single-arm longitudinal study (with a nested qualitative study) that evaluates the effectiveness of a program for training psychologists in delivering READY for MS. The training encompassed three phases: 1) training workshop; 2) READY participation; 3) READY delivery to people with MS (PwMS). Self-report data were collected immediately before the workshop, before and after the participation in READY, and at three and 15-month follow-ups. Forty-four psychologists successfully completed Phases 1 and 2, 40 Phase 3. Both quantitative and qualitative results showed the training was effective in fostering the acquisition of knowledge and skills for effective delivery of READY to PwMS. Growth curve modelling showed that participants improved over the course of training

in resilience, positive affect, wellbeing, psychological flexibility and associated processes. These improvements peaked during the participation in READY phase and continued to accrue at a slower rate three months later. Psychological flexibility mediated the improvements in resilience, positive affect and wellbeing. Qualitative data confirmed the personal, professional and community level positive training impacts.

Study 3 aims to evaluate the effectiveness of READY for MS delivered to PwMS via frontline Italian services. This is a single-arm longitudinal study (with a nested qualitative study). Data were collected immediately before the beginning of the program, after the booster session and at 3-months follow-up. Thirty-three READY groups (237 participants) were run. Participants improved in resilience (primary outcome), anxiety, depression, stress, health-related quality of life (HRQoL), and psychological flexibility and associated processes (acceptance, defusion and values). Improvements on most outcomes occurred at post-intervention and were maintained at 3-month follow-up. No demographic or illness variables predicted these improvements. Psychological flexibility mediated improvements in resilience, anxiety, depression, stress, and HRQoL. Qualitative data confirmed READY feasibility and the positive psychological impacts on participants.

Result of the previous studies were discussed in two dedicated meetings (January 2020). The panel discussion informed the design of the multi-centre RCT (Study 4). The multi-centre RCT is ongoing and will be completed at the end of December 2023. Ten groups have been run so far and 190 participants enrolled.

## CONCLUSIONS

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. No demographic or illness variables predicted these improvements. This result is particularly important as it indicates that the program is highly accessible and easy to implement in different settings (MS or AISM centre, different geographical areas or centre size). Study 2 results suggested that the training was personally and professionally helpful for the MS psychologists (with long term maintenance of the subjective gains) and the integration of program delivery within patients' association branches and MS Centres was effective.

The multicentre RCT will provide additional information on the possible superiority of READY for MS over relaxation observed during the pilot study (qualitative data).

In conclusion, reached different goals: 1) to test the efficacy and effectiveness of the READY for MS; to train dozens of psychologist in successfully running a READY for MS group; 3) to offer hundreds of PwMS from all Italy to participate in a READY for MS group, with great results in terms of effectiveness and accessibility. Moreover, AISM signed a copyright agreement to ensure the ongoing delivering of READY for MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

### Pubblicazioni/Publications

- Giovannetti AM, Quintas R, Tramacere I, Giordano A, Confalonieri P, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham KI. (2020). A resilience group training program for people with multiple sclerosis: Results of a pilot single-blind randomized controlled trial and nested qualitative study. *PLoS One*. 2020 Apr 9;15(4):e0231380. doi: 10.1371/journal.pone.0231380
- Giovannetti AM, Solari A, Pakenham KI; READY Facilitator Team. Effectiveness of a group resilience intervention for people with multiple sclerosis delivered via frontline services. *Disabil Rehabil*. 2022 Nov;44(22):6582-6592. doi: 10.1080/09638288.2021.1960441
- Giovannetti AM, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham KI. Evaluation of a program for training psychologists in an acceptance and commitment therapy resilience intervention for people with multiple sclerosis: a single-arm longitudinal design with a nested qualitative study. *Disabil Rehabil*. 2022 Nov;44(22):6926-6938. doi: 10.1080/09638288.2022.2025926
- Giovannetti AM, Pakenham KI, Presti G, Quartuccio ME, Confalonieri P, Bergamaschi R, Grobberio M, Di Filippo M, Micheli M, Brichetto G, Patti F, Copetti M, Kruger P, Solari A. A group resilience training program for people with multiple sclerosis: Study protocol of a multi-centre cluster-randomized controlled trial (multi-READY for MS). *PLoS One*. 2022 May 2;17(5):e0267245. doi: 10.1371/journal.pone.026724

### Conference abstracts published in international peer reviewed journals

- Giovannetti AM, Quintas R, Giordano A, Messmer Uccelli M, Solari A, Pakenham K. (2018). READY for MS, a group intervention to promote resilience in people with multiple sclerosis: a single blind RCT with a nested qualitative study. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(6), 853-853
- Giovannetti AM, Quintas R, Matarozzi K, Giordano A, Solari A, Pakenham K. (2018). Individualized quality of life in people with MS: advantages of using the SEIQOL-DW. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(6), 848-848

### Comunicazioni a Congressi/Congress 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
- 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 20 - 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 "Inter-clinical Symposium on Multiple Sclerosis" - Athens, Greece, October 18-20th 2019
- Giovannetti, A.M. Evaluation of Acceptance and Commitment Training for psychologists working with people with multiple sclerosis. Oral presentation was scheduled in June 2020, but the conference was postponed due to the COVID-19 pandemic. I will present it during the RIMS Digital Conference - December 4-5, 2020

### Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2016 e l'ammontare di 213.000 €

FISM Research special project funded in 2016 and the amount of € 213,000

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



## Giampaolo Brichetto

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, Genova, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

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

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

**Alessandro Verri, Annalisa Barla, Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università di Genova, Genova, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è classificata principalmente in tre decorsi di malattia: recidivante remittente (RR), caratterizzato da attacchi definiti di peggioramento della funzione neurologica seguita da periodi di recupero parziali o completi; secondariamente progressiva (SP), che segue il decorso della RR ed è caratterizzato da un progresso più costante; primariamente progressiva (PP), caratterizzato da costante peggioramento della funzione neurologica fin dall'esordio. In particolare, l'identificazione del punto di transizione tra RR e SP è estremamente complessa, anche se cruciale per migliorare il processo decisionale del piano terapeutico e l'impatto sulle strategie farmacologiche e riabilitative.

Attualmente, le linee guida per la gestione della SM richiedono l'esecuzione di almeno un esame di risonanza magnetica (RM) all'anno, mentre una valutazione meno frequente è richiesta nella fase progressiva della malattia. Infatti, la RM è essenziale nel processo diagnostico e nella valutazione prognostica della malattia. Il pattern di lesioni RM è attualmente integrato nei criteri diagnostici, ma il gap clinico-radiologico non è stato ancora colmato. Nel recente passato, la ricerca in SM si è soffermata sullo studio dei Patient-Centered 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 speciale FISM attivo 'PROMOPRO-MS' ha lo scopo di identificare un set di PCO legati a mobilità, fatica, performance cognitive, stato emotivo, continenza vescicale, qualità di vita, validare un profilo funzionale della SM basato su variabili e misure significative per l'SM, migliorare la detezione del decorso di malattia, predire la progressione della malattia e identificare i migliori predittori di malattia.

## RISULTATI

Dal 2013 PROMOPRO-MS costituisce una coorte di persone con SM (PcSM) in continua crescita. Ad oggi, abbiamo eseguito più di 5000 valutazioni da circa 1200 pazienti tra quelli seguiti dai Servizi di Riabilitazione dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM) di Genova, Padova, Vicenza. In questa coorte, ogni paziente è valutato ogni quattro mesi attraverso vari PCOs che ricoprono domini significativi per la SM. Il database ottenuto, oltre ai PCO, contiene anche informazioni aggiuntive quali: i) numero di ricadute negli ultimi quattro mesi (NR), ii) il livello educativo espresso in termini di anni totali di educazione (EDU), iii) altezza (A), iv) peso (P) a v) decorso di malattia. Basandosi su questi dati è stato sviluppato un modello temporale predittivo dell'evoluzione della malattia con particolare focalizzazione sulla detezione della transizione da forma RR a forma SP. Il modello è stato sviluppato utilizzando tecniche di machine learning ed è capace di predire il futuro decorso di patologia delle PcSM con un'accuratezza di circa l'85%, dimostrando al contempo che i PCO possono essere di grande valore come predittori dell'andamento della SM.

## CONCLUSIONI

Per poter migliorare l'accuratezza di predizione, è iniziato lo sviluppo di PROMOPRO-MS Digital Edition, che verrà integrato nel nuovo software, anch'esso in sviluppo SMART-Rehab, dei servizi Servizi di Riabilitazione dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM) di Genova,

Como, Aosta, Padova, Vicenza. In questo contesto per la fine del 2023 è previsto il rilascio della versione digitale che consentirà di raggiungere ulteriori persone con SM e incrementare la quantità di dati migliorando ulteriormente gli algoritmi di predizione.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is mainly classified into three disease courses: Relapsing-Remitting (RR), characterized by clearly defined attacks of worsening neurologic function followed by partial or complete recovery periods; Secondary-Progressive (SP), that follows after the RR course and is characterized by a steadier progress; Primary-Progressive (PP), characterized by steadily worsening neurologic function from the beginning. In particular, the identification of the transition point when RR converts to SP is extremely challenging, although crucial in order to improve therapeutic options decision-making and impact on pharmacological and rehabilitative strategies.

Nowadays, best practice for MS management requires the performance of at least one Magnetic Resonance Imaging (MRI) examination per year, while a less frequent assessment is required in the progressive phase of the disease. Indeed, MRI is now essential in the diagnostic process and prognostic evaluation of the disease. MRI lesion pattern is currently integrated in the diagnostic criteria, but the clinical-radiological gap has not been filled yet.

In the recent past, researchers explored the potential role of Patient-Centered Outcomes (PCO) to follow the progression of neurodegenerative diseases and to take timely decisions. PCOs comprise self- and physician-administered tests, questionnaires and clinical scales consisting of either ordinal or categorical scaled answers. To date, PCOs are extensively used to assess general health status, to support diagnosis and monitor progress of disease and to quantify the patients' perception of the effectiveness of a given therapy or procedure.

The ongoing FISM special project "A new functional profile to monitor the progression of disability in MS" (PROMOPRO-MS), aims at identifying a set of PCO related to mobility, fatigue, cognitive performances, emotional status, bladder continence, quality of life, validating a "functional profile" of MS based on meaningful variables and measures, improving the disease course detection, predicting the disease progression and identifying the best disease predictors.

## RESULTS

Since 2013 PROMOPRO-MS constitutes a growing cohort of people with MS (PwMS). To date, we collected more than 5000 evaluations from about 1200 patients among those followed by the Rehabilitation Services of the Italian Multiple Sclerosis Society (AISM) of Genova, Padua, Vicenza. In this cohort, each patient is evaluated every four months through several PCOs covering meaningful domains for MS. The collected PCO data set comprises additional information such as: i) number of relapses in the last four months (NR), ii) educational level expressed in terms of total years of education (EDU), iii) height (H), iv) weight (W) and v) disease course. Based on this data a predictive temporal model of the disease evolution was developed with particular focus on the detection of the RR to SP transition. The model has been developed by using machine learning techniques and is able to foresee the future disease course of PwMS with an accuracy of about 85%, demonstrating that PCO are valuable to be used as MS disease course predictor.

## CONCLUSIONS

In order to improve the prediction accuracy, the development of PROMOPRO-MS Digital Edition has begun, which will be integrated into the new software, also under development SMART-Rehab, of the Rehabilitation Services of the Italian Multiple Sclerosis Association (AISM) of Genova, Como, Aosta, Padua, Vicenza. In this context, the release of the digital version is expected by the end of 2023, which will make it possible to reach more people with MS and increase the amount of data by further improving the prediction algorithms.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Bricchetto G, Monti Bragadin M, Fiorini S, Battaglia MA, Konrad G, Ponzio M, Pedullà L, Verri A, Barla A, Tacchino A. *The hidden information in patient-reported outcomes and clinician-assessed outcomes: multiple sclerosis as a proof of concept of a machine learning approach.* *Neurol Sci.* 2020 Feb;41(2):459-462. doi: 10.1007/s10072-019-04093-x. Epub 2019 Oct 28.
- Prada V, Tacchino A, Podda J, Pedullà L, Konrad G, Battaglia MA, Bricchetto G, Monti Bragadin M. *Mam36 and Abilhand as outcome measures of multiple sclerosis hand disability: an observational study.* *Eur J Phys Rehabil Med.* 2020 Dec 11. doi: 10.23736/S1973-9087.20.06446-1. Epub ahead of print
- Tacchino A, Ponzio M, Pedullà L, Podda J, Bragadin MM, Pedrazzoli E, Konrad G, Battaglia MA, Mokkink L, Bricchetto G. *Italian validation of the Arm Function in Multiple Sclerosis Questionnaire (AMSQ).* *Neurol Sci.* 2020 Nov;41(11):3273-3281. doi: 10.1007/s10072-020-04363-z. Epub 2020 May 12
- Bricchetto G, Zaratini P. *Measuring outcomes that matter most to people with multiple sclerosis: the role of patient-reported outcomes.* *Curr Opin Neurol.* 2020 Jun;33(3):295-299. doi: 10.1097/WCO.0000000000000821

### **Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 380.000 €**

FISM Research special project funded in 2013 and the amount of € 380,000

# Design, sviluppo e test di usabilità di un'app per l'autovalutazione e il monitoraggio dei disturbi cognitivi nelle persone con sclerosi multipla: DIGICOG-MS



**Jessica Podda**

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM, Genova, Italia

COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Giampaolo Brichetto, Andrea Tacchino, Ludovico Pedullà, Michela Ponzio**

## PREMESSE E OBIETTIVI

I vantaggi della telemedicina, definita come insieme di tecniche mediche ed informatiche per l'assistenza e la cura a distanza, sono stati incredibilmente confermati durante la pandemia di Covid-19. La digitalizzazione della sanità, in grado di favorire il passaggio da un modello di cura center-based ad uno patient-based, è avvertita come prioritaria per le persone con sclerosi multipla (SM), che necessitano di una presa in carico tempestiva e continuativa. La sfida dunque per clinici e ricercatori è sfruttare le potenzialità offerte dalle tecnologie al servizio della salute per garantire un'assistenza di qualità a distanza per tutte le persone con SM. Recentemente si è assistito allo sviluppo di svariati strumenti digitali, come app e software computerizzati, per lo screening e il monitoraggio dei disturbi cognitivi, uno dei sintomi più invalidanti nella SM, che interessano il 40-70% delle persone con SM. Documentati in tutte le forme di malattia, le funzioni cognitive maggiormente colpite sono attenzione e concentrazione, velocità nell'elaborazione delle informazioni, memoria e apprendimento, funzioni esecutive e linguaggio. Le alterazioni del funzionamento cognitivo, associate a disturbi dell'umore, rischio di cadute e incidenti stradali e principali cause di inoccupazione e isolamento sociale, meritano quindi un intervento precoce attraverso una valutazione mirata per accertare la presenza o meno del deficit, determinarne la gravità e le conseguenze sulla qualità di vita. Sebbene i risultati nell'utilizzo e nell'accettazione delle nuove tecnologie siano piuttosto promettenti, l'eterogeneità in termini di caratteristiche cliniche (e.g., le difficoltà motorie all'arto superiore possono rendere complicato l'uso di mouse o tastiera in autonomia) e personali (e.g., una eventuale scarsa expertise digitale dovuta all'età può compromettere l'utilizzo e l'ac-

cettazione di nuovi dispositivi elettronici) delle persone con SM che presentano disturbi cognitivi induce a riflettere sulla reale adeguatezza delle tecnologie attualmente disponibili.

Lo studio si propone quindi i seguenti obiettivi: design, sviluppo e test di usabilità di DIGICOG-MS<sup>®</sup>, app per smartphone e tablet per l'autovalutazione e il monitoraggio del funzionamento cognitivo; test del livello di accordo tra la somministrazione dei test tramite app (modalità digitale) e quella tradizionale (modalità carta e matita).

Inoltre, sarà valutato l'impatto di variabili demografiche e cliniche sul grado di usabilità e accettabilità di DIGICOG-MS<sup>®</sup>.

## RISULTATI

La fase di design e sviluppo dell'app è iniziata ad Aprile 2022 e terminata a Gennaio 2023. L'architettura di DIGICOG-MS<sup>®</sup> al momento si compone di quattro test digitali che prendono spunto da quelli carta e matita psicometricamente validi e utilizzati per valutare le abilità cognitive interessata dalla SM come velocità di elaborazione delle informazioni, memoria verbale e visuo-spaziale, e linguaggio. I risultati preliminari sull'usabilità dello strumento, ottenuti su un campione di 49 persone con SM, indicano che l'utilizzo di DIGICOG-MS<sup>®</sup> risulta essere significativamente apprezzato, come indicato dal punteggio totale alla scala mHealth App Usability Questionnaire di  $114.16 \pm 14.38$  (cut-off  $\geq 72$ ; range 18-126).

## CONCLUSIONI

Rilevanza per la SM. DIGICOG-MS<sup>®</sup> consentirebbe alle persone con SM di accedere ad un'autovalutazione e un monitoraggio a distanza del proprio funzionamento cognitivo, servizi di assistenza che rischierebbero invece

essere preclusi nei casi in cui le persone si trovino impossibilitate a recarsi al centro clinico per effettuare uno screening cognitivo a causa di molteplici condizioni critiche (e.g., restrizioni di guida, costi economici, dipendenza dal caregiver o amici, eccessiva distanza centro clinico-domicilio, fatica e disturbi motori). Inoltre i benefici sono estesi anche ai professionisti sanitari che possono contare su uno strumento addizionale utile in fase decisionale: DIGICOG-MS® fornirebbe un aiuto prezioso al clinico poiché semplificherebbe la somministrazione dei test, miglioran-

do l'accuratezza e riducendo la percentuale di errori in fase di valutazione e scoring.

Prossimità alla cura. Il monitoraggio continuo nel tempo permetterebbe al clinico in primo luogo di individuare un trattamento riabilitativo cognitivo personalizzato sulle caratteristiche e i bisogni di ciascuna persona con SM. Inoltre, i dati raccolti attraverso DIGICOG-MS® consentirebbero di identificare la presenza di fenotipi cognitivi nella SM e di predire l'evoluzione del declino cognitivo nel tempo, grazie a sofisticati algoritmi di machine learning.

## Design, development and usability of a mHealth app for self-assessment and monitoring of cognitive impairment in people with Multiple Sclerosis: DIGICOG-MS

### INTRODUCTION AND AIMS

The advantages of telemedicine over usual care have been increasingly confirmed during health global emergency due to COVID-19. Increasing evidence indicates that also for people with Multiple Sclerosis (PwMS) the time is right to shift from a center-based paradigm toward a personalized patient-based care thanks to technological tools. Easy-to-use digital solutions are needed to screen for and monitor the cognitive impairment (CI) experienced by almost 43-70% and documented in all MS courses.

Addressing CI is recognised as a quality indicator in MS care. Development of digital solutions as apps or computerized software for self-assessment and monitoring of CI is also occurring in MS with promising results. Nevertheless, the heterogeneity of personal and clinical characteristics of PwMS, ranging from younger, active, and autonomous individuals to older, sedentary, and dependent people, leads to a wide spectrum of symptoms and different needs. Thus, it is imperative that digital alternatives need to be adequately designed and tailored to patients' clinical condition, favoured way of working and thinking, and thus acceptable to the final end users.

Aims of this research project are to: design, development and usability test of DIGICOG-MS®, a time-efficient, smartphone- and tablet-based app for self-assessment of CI in PwMS, and test the degree of agreement between DIGICOG-MS® and traditional assessment.

### RESULTS

The first step that consists of the design and development of DIGICOG-MS® has been carried out between April 2022 and January 2023. Now, DIGICOG-MS® includes four digital tests taking inspiration from valid

paper-and-pencil tests that evaluate the most affected cognitive domains as information processing, verbal memory, visuo-spatial memory and language. Concerning app usability, preliminary results on 49 PwMS suggests that DIGICOG-MS® was well appreciated, as indicated by mHealth App Usability Questionnaire total score of  $114.16 \pm 14.38$  (cut-off  $\geq 72$ ; range 18-126).

### CONCLUSIONS

Relevance for MS. Although preliminary, findings indicated that DIGICOG-MS® is highly usable and accepted by PwMS. DIGICOG-MS® could allow a continuous self-evaluation and monitoring of cognitive functioning that otherwise could be prevented for PwMS due to various critical conditions (e.g., driving restrictions, reliance on caregivers and friends for assistance, restricted income, hospital-home distance, weakness and motor impairment). The use of DIGICOG-MS® would also be beneficial for health professionals who can take advantage of a digital tool able to reduce time and errors in administration and scoring procedures.

Proximity to cure. A continuous monitoring of cognitive functions would help health professionals to plan a cognitive intervention tailored on personal and clinical characteristics of PwMS. In addition, data acquired through DIGICOG-MS® will permit to identify cognitive phenotypes in MS and to predict cognitive decline over time thanks to sophisticated machine learning algorithms.



**Progetto di ricerca FISM finanziato nel 2021 e l'ammontare di 90.660 €**  
FISM Research special project funded in 2021 and the amount of € 90,660

# 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, Firenze, Italia

### 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, Ospedale di Gallarate, Gallarate (VA), Italia

**Maria Trojano, Rosa Gemma Viterbo, Marta Simone**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari, Italia

**Eleonora Cocco, Giuseppe Fenu**, MS Centro, Ospedale Binaghi, Dipartimento Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

**Giancarlo Comi, Lucia Moiola, Monica Falautano**, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

**Giovanni Mancardi**, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Genova, Genova, Italia

**Ruggero Capra**, Centro Regionale SM, Presidio di Montichiari, Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italia

**Renzo Guerrini, Federico Melani**, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'esordio della sclerosi multipla (SM) prima dei 18 anni si verifica nel 3-10 % della totalità dei pazienti con SM. Circa il 30% dei bambini e adolescenti con SM manifestano deficit cognitivi, in particolare a carico dell'attenzione e della velocità di elaborazione delle informazioni, della memoria, delle funzioni esecutive e delle funzioni visuo-motorie, domini che sono frequentemente colpiti anche nella SM degli adulti. Il linguaggio può essere coinvolto soprattutto nei casi infantili 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; b) in un sottogruppo di pazienti, lo studio con RM strutturale e funzionale delle modifiche del pattern di attivazione cerebrale e della plasticità strutturale dopo il training, da interpretarsi in combinazione coi risultati neuropsicologici. Dopo una fase preliminare all'avvio dello studio, necessaria per la messa a punto dell'applicazione, il suo test preliminare su un campione limitato di soggetti sani e malati, lo studio prevede una fase di training comune degli operatori coinvolti per standardizzare tra i centri la valutazione neuropsicologica dei soggetti, e le istruzioni da fornire per l'uso dell'applicazione, quindi l'implementazione del trial randomizzato, il follow up dei soggetti, l'analisi e pubblicazione dei risultati.

## RISULTATI

Il training è stato somministrato ad un gruppo di 30 controlli sani (10 Maschi, 20 Femmine con età media di 15.8 anni con deviazione standard di 2.21; età media di scolarizzazione di 12,3 anni con deviazione standard di 1,7), per la messa a punto dell'applicazione (compliance e fattibilità).

Per il gruppo di studio sono stati arruolati, e randomizzati, 30 bambini e adolescenti con SM di cui 11 Machi e 19 Femmine con età media di 14,8 (deviazione standard 3,2) e scolarità media 12,3 (deviazione 2,3).

Ad oggi tutti i centri coinvolti nello studio hanno ottenuto l'approvazione del Comitato etico e completato l'arruolamento. La tabella 1 riassume lo stato di arruolamento.

**TABELLA 1. CENTRI PARTECIPANTI E STATO DELL'ARRUOLAMENTO**

<b>CENTRI PARTECIPANTI</b>	<b>PZ SCREENATI</b>	<b>PZ ARRUOLATI</b>
<i>Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer</i>	5	3
<i>Università degli Studi di Bari</i>	12	12
<i>Spedale Civile di Brescia</i>	11	0
<i>Università degli Studi di Cagliari</i>	9	7
<i>Ospedale San Antonio Abate, Gallarate</i>	3	2
<i>Università degli Studi di Genova</i>	2	1
<i>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano</i>	8	5

# Home-based, computer-assisted cognitive rehabilitation for attention in pediatric onset Multiple Sclerosis: a pilot multicenter study

## INTRODUCTION AND AIMS

Onset of MS before the age of 18 accounts for 3-10% of the whole MS population. Approximately 30% of children and adolescents with MS experience CI, particularly in the domains of attention and speeded processing, memory, executive functions and visuomotor functions, which are also commonly involved in adult-onset MS (AOMS). Language may be also involved, particularly in POMS with younger age at onset. CI in POMS can have a profound negative impact on patients' lifestyle and school achievements, also independent from physical disability.

Despite the growing interest in the field, so far no specific intervention (neither pharmacological nor rehabilitative) tailored for the needs of the pediatric population has proved to be effective.

The primary aim of this multicentric randomized, double blind, controlled study is to preliminarily evaluate the feasibility and effectiveness of a computer-based training of attention, specifically developed for this purpose. Secondary objectives are a) assessment of demographic and clinical predictors of treatment response, including proxies of the subject cognitive reserve; b) in a sub-group of subjects, structural and fMRI analyses of changes in the pattern of brain activations and structural plasticity after the training program, to be interpreted in combination with neuropsychological results.

## RESULTS

The training was administered to a group of 30 healthy controls (10 males, 20 females with a mean age of 15.8

and SD of 2.21; Mean education, years 12.3 and SD of 1,7), for the development of the application (compliance and feasibility).

For the study group 30 children and adolescents with MS were enrolled and randomized: 11 males, 19 females with

a mean age of 14.8 (SD of 3.2) and mean education, years 12.4 (SD of 2,3)

To date, all the centers involved in the study have obtained approval from the Ethics Committee and completed enrollment. Table 1 summarizes the enrollment status.

**TABLE 1. ENROLLMENT STATUS**

PARTECIPATING CENTERS	PT SCREENED	PT ENROLLED
Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer	5	3
Università degli Studi di Bari	12	12
Spedale Civile di Brescia	11	0
Università degli Studi di Cagliari	9	7
Ospedale San Antonio Abate, Gallarate	3	2
Università degli Studi di Genova	2	1
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano	8	5



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

- Amato MP, Langdon D, Montalban X et al. Treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis: position paper. *J Neurol.* 2013 Jun;260(6):1452-68.
- Amato MP, Krupp LB, Charvet LE, Penner I, Till C. Pediatric multiple sclerosis: Cognition and mood. *Neurology.* 2016 Aug 30;87(9 Suppl 2):S82-7.
- Ruano L, Branco M, Portaccio E et al. Patients with paediatric-onset multiple sclerosis are at higher risk of cognitive impairment in adulthood: An Italian collaborative study. *Mult Scler.* 2017 Jun 1.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Cognitive and psychosocial features of childhood and juvenile MS. *Neurology.* 2008 May 13;70(20):1891-7.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Cognitive and psychosocial features in childhood and juvenile MS: two-year follow-up. *Neurology.* 2010 Sep 28;75(13):1134-40.
- Amato MP, Goretti B, Ghezzi A et al. Neuropsychological features in childhood and juvenile multiple sclerosis: five-year follow-up. *Neurology.* 2014 Oct 14;83(16):1432-8.
- Tacchino A, Pedullà L, Bonzano L et al. A New App for At-Home Cognitive Training: Description and Pilot Testing on Patients with Multiple Sclerosis. *JMIR Mhealth Uhealth.* 2015 Aug 31;3(3):e85.

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 220.000€**  
 FISM Research special project funded in 2017 and the amount of € 220,000

# ENACT: Impiegare soluzioni neuroergonomiche per attenuare il tremore cerebellare

[www.enactproject.eu](http://www.enactproject.eu)



## Giacinto Barresi

*Rehab Technologies Lab, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova, Italia*

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Giampaolo Bricchetto, Jessica Podda, Andrea Tacchino, Ludovico Pedullà, Chiara Galletti, Yelena Tonoyan, Giulia Mariani, Mirco Di Salvo, Riccardo Galviati, Paolo Bianchino, Marco Freddolini, Giulia Aurora Albanese, Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), Genova, Italia**  
**Lorenzo De Michieli, Marco Crepaldi, Jacopo Zenzeri, Alessio Del Bue, Nicolò Boccardo, Claudio Lorini, Giorgio Zini, Laura Salatino, Chiara Storchi, Andrea Ferrari, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova, Italia**

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

**Fabrizio Lamberti, Andrea Bottino, Dipartimento di Automatica e Informatica, Politecnico di Torino, Torino, Italia**  
**Manish Chahuan, University of York, York, UK**  
**Michael Holmes, Brock University, St. Catharines, ON, Canada**  
**Massimiliano de Zambotti, SRI International, Menlo Park, CA, USA**  
**Vineet Vashista, Indian Institute of Technology, Gandhinagar, India**  
**Claudio Pacchierotti, CNRS, IRISA, Université de Rennes, Inria Rennes, Rennes, France**  
**Satoshi Muraki, Faculty of Design, Kyushu University, Fukuoka, Giappone**  
**Marta Bertolaso e Laura Corti, Unità di Ricerca di Filosofia della Scienza e dello Sviluppo Umano, Campus Bio-Medico di Roma, Roma, Italia**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto ENACT (impiegare soluzioni neuroergonomiche per attenuare il tremore cerebellare) mira a studiare il tremore cerebellare negli arti superiori in persone con sclerosi multipla (SM) al fine di realizzare soluzioni indossabili per mitigarlo durante le attività quotidiane e la riabilitazione. Contestualmente, il progetto mira ad utilizzare ambienti interattivi di realtà virtuale e mista sia per investigare il tremore cerebellare, sia per realizzare exergame motorio-cognitivi atti a promuovere l'attività riabilitativa a livello degli arti superiori, coinvolgendo le persone con SM durante l'esecuzione dei compiti previsti a livello clinico. I dati a livello motorio e fisiologico saranno inoltre esplorati anche a scopo diagnostico e prognostico. Per raggiungere tali risultati, ENACT adotta l'approccio della neuroergonomia: l'indagine neuroscientifica delle interazioni uomo-macchina per progettare tecnologie centrate sull'utente.

## RISULTATI

Il progetto è iniziato nell'ottobre 2021. Durante il primo anno di ENACT, il team si è concentrato su attività di ricerca tecnologica: diversamente da altri progetti, in ENACT è necessario partire dallo sviluppo di tecnologia prima di poter procedere verso la raccolta di dati sperimentali. Il gruppo ha quindi innanzitutto lavorato a progettazione e sviluppo di un sistema di realtà virtuale completo per exergame basati su compiti di presa e rilascio di oggetti, necessari per indagare il tremore cerebellare e per testare soluzioni atte a coinvolgere gli utenti durante esercizi motorio-cognitivi con funzionalità di gioco di biofeedback secondo paradigmi di dual task. Lo stesso sistema è stato sviluppato per raccogliere dati sulla coordinazione occhio-mano in relazione al tremore. Inoltre, il team ha implementato oggetti stampati in 3D associabili ai loro corrispettivi virtuali per arricchire l'esperienza e il coinvolgimento dell'utente.

Durante il primo anno del progetto è stato anche progettato un prototipo di sistema indossabile per la mitigazione del tremore e il suo sviluppo porterà a un dispositivo medico che sarà testato durante il terzo anno di ENACT, in base ai test sperimentali del secondo anno. Le prime pubblicazioni sui risultati del progetto saranno rilasciate nel corso del 2023 (il protocollo clinico diventerà attivo a marzo 2023), a partire dalla valutazione degli ambienti virtuali sviluppati nel corso del 2022.

Inoltre, il PI ha dedicato parte delle sue attività alla divulgazione e all'impegno pubblico per promuovere il progetto in eventi nazionali ed internazionali (come RehabWeek 2022 a Rotterdam), instaurando collaborazioni con esperti in ambito sia clinico che tecnologico. È stata anche stabilita una sinergia con NRTWIN (NeuroRobotic TWINning), progetto di cui il PI di ENACT è co-coordinatore nel quadro di RAISE, hub ligure finanziato dal PNRR.

## CONCLUSIONI

Rilevanza per la SM. L'ambiente interattivo a basso costo e il sistema indossabile di ENACT per indagare e mitigare il tremore cerebellare negli arti superiori sono progettati (e saranno ulteriormente riprogettati in base a dati sperimentali) per essere utilizzati da persone con SM. Rispettivamente, l'ambiente interattivo è progettato per essere utilizzato durante la riabilitazione e il sistema indossabile durante le attività della vita quotidiana, consentendo (nella sua versione finale) a studenti e lavoratori di essere attivi senza utilizzare dispositivi ingombranti e poco confortevoli per attenuare il sintomo. Un prototipo avanzato verrà rilasciato e validato con dimostrazioni sul campo entro il 3° anno di progetto. Queste soluzioni dovrebbero anche raccogliere nuovi dati sul progresso della SM (in particolare per prevedere l'eventuale transizione alla forma progressiva) e l'esito dei protocolli riabilitativi: ENACT mira a identificare nuovi marcatori

della SM in termini di firma motoria e fisiologica del tremore cerebellare. Tali dati saranno analizzati da una piattaforma computazionale (correlandoli con questionari soggettivi e test clinici quantitativi, profili genetici e test di imaging) al fine di valutare le condizioni individuali e personalizzare gli interventi clinici.

Prossimità verso l'individuazione di meccanismi patogenetici. La rilevanza di ENACT per la ricerca dei meccanismi patogenetici della SM deriverà inizialmente dalle indagini sugli indici motori e fisiologici del tremore cerebellare in funzione dell'esplorazione di nuovi aspetti dei processi sensomotori alla base del sintomo. Particolare attenzione è rivolta alle metriche di coordinazione occhio-mano che contribuiranno, insieme ad altri indici motori e fisiologici, alle indagini neuroscientifiche in setting interattivi e alla calibrazione in tempo reale delle stimolazioni multimodali che sopprimono il tremore. L'indagine sui meccanismi patogenetici della SM è inoltre arricchita dall'integrazione di tecnologie non invasive (sensori motori e fisiologici, stimolatori multimodali) all'interno di sistemi indossabili e portatili: consentiranno di raccogliere dati nei contesti della vita quotidiana dei soggetti, facilitando la correlazione della progressione dei sintomi della SM con i marcatori. Prossimità alla cura. ENACT mira a facilitare le procedure riabilitative attraverso l'adozione delle tecnologie coinvolgenti della sua piattaforma interattiva, basata sulla realtà virtuale e mista per migliorare la compliance sperimentale e clinica dei pazienti. Pertanto, queste funzioni coadiuvano gli interventi riabilitativi. I dati raccolti durante gli esercizi saranno utilizzati per esplorare eventuali strategie per mitigare il tremore cerebellare. In ogni caso, i modelli della piattaforma computazionale potrebbero consentire l'impiego di biomarcatori del tremore cerebellare per valutare l'esito di trattamenti invasivi e modularli nel tempo.

# ENACT: Employing Neuroergonomic solutions to Attenuate the Cerebellar Tremor

[www.enactproject.eu](http://www.enactproject.eu)

## INTRODUCTION AND AIMS

The ENACT (Employing Neuroergonomic solutions to Attenuate the Cerebellar Tremor) project aims to investigate the cerebellar tremor in upper limbs in people with multiple sclerosis (MS) in order to devise wearable technologies for mitigating it during daily activities and rehabilitation. Simultaneously, the project aims to use interactive environments in virtual and mixed reality for investigating the cerebellar tremor and for implementing motor-cognitive exergames designed to promote the individual compliance to upper limb rehabilitation procedures, engaging people with MS during clinical tasks. Furthermore, the motor

and physiological data collected during this project will be explored in terms of diagnostic and prognostic applications. In order to achieve such results, ENACT adopts the approach of neuroergonomics: the neuroscientific investigation of human-machine interactions to design user-centered technologies.

## RESULTS

The project started on October 2021. During the first year of ENACT, the team focused on technological research: unlike other projects, in ENACT it is necessary to start from the development of technology before being able to

proceed towards the collection of experimental data and the publications. Thus, the team has worked on designing and developing a complete virtual reality system for exergames based on pick & place tasks required to investigate the cerebellar tremor and to test solutions for engaging the users during motor-cognitive exercises with biofeedback game features according to dual tasks paradigms. The same system was developed for collecting data on eye-hand coordination, a process that the team considered as a priority for the investigations related to intention tremor in upper limbs. Additionally, the team implemented 3D-printed items for enabling the manipulation of virtual objects associated to physical objects in order to improve the user experience and engagement. During the first year of the project, a prototype of wearable system for tremor mitigation has also been designed and its development will lead to a medical device that will be tested during the third year of ENACT according to the experimental tests of the second year.

The project results will be published during 2023 (the clinical protocol will become active on March 2023), starting with the evaluation of the virtual environments developed during 2022. Additionally, the PI dedicated part of his activities to dissemination and public engagement to promote the project in national and international events (like RehabWeek 2022 in Rotterdam), even establishing collaborations with clinical and technological experts. A synergy was also established with NRTWIN (NeuroRobotic TWINning), a project (the PI of ENACT is its co-coordinator) in the framework of RAISE, the Ligurian hub funded by the NRRP.

## CONCLUSIONS

Relevance for MS. The low-cost interactive environment and wearable system of ENACT to investigate and to mitigate the cerebellar tremor in upper limbs are designed (and they will be further re-designed according to experimental data) to be used by people with MS. Respectively, the interactive environment is designed for being used during rehabilitation and the wearable system during activities of daily living, enabling (in its final version) students and workers to be active without using cumbersome and awkward devices to attenuate the symptom. An advanced

prototype will be released and validated with field demonstrations by the 3rd year of the project. These solutions should also collect novel data on the MS progress (especially in order to predict the transition to the progressive form) and the outcome of rehabilitative protocols: ENACT aims to identify novel markers of MS within the motor and physiological signature of the cerebellar tremor. Such data will be analysed by a computational platform (correlating them with subjective questionnaires and clinical quantitative tests, genetic profiles, and imaging tests) in order to assess the individual conditions and personalize the clinical interventions.

Proximity to find new pathogenic mechanism. The relevance of ENACT for the research of MS pathogenic mechanisms will derive initially from the investigations on the motor and physiological indices of cerebellar tremor according to novel aspects of the sensorimotor processes underlying the symptom. Particular attention is paid to metrics of eye-hand coordination that will contribute, alongside with other motor and physiological indices, to the neuroscientific investigations in interactive settings and to the real-time calibration of the multimodal stimulations suppressing the tremor. Additionally, the investigation of the pathogenic mechanisms of MS is enriched by the integration of non-invasive technologies (motor and physiological sensors, multimodal stimulators) within wearable and portable systems: they will allow to collect data outside the laboratory or the clinical settings, along days and weeks in the contexts of daily living of the subjects, easing the correlation of MS symptoms progression with biological markers.

Proximity to cure. ENACT aims at facilitating the rehabilitative procedures through the adoption of the engaging technologies of the interactive platform, based on virtual and mixed reality for improving the experimental and clinical compliance of the patients. Thus, these functions will assist the rehabilitative interventions. As in the main goals of the project, the data collected during the exercises will be used to explore potential new strategies to mitigate of the cerebellar tremor. On the other hand, the models of the computational platform could allow to exploit the cerebellar tremor biomarkers to evaluate the outcome of invasive treatments and modulate them over time.



# Descrizione dell'aderenza alle principali campagne di medicina preventiva nelle persone con sclerosi multipla



## Daiana Bezzini

*Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia*

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

**Stefano De Biase**, *Aulss3- Ospedale dell'Angelo, Mestre, Italia*

**Monica Ulivelli**, *Università degli Studi di Siena, Siena, Italia*

**Marco Salvetti**, *Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

**Eugenio Pucci**, *Ospedale Augusto Murri di Fermo, Fermo (RI), Italia*

**Eleonora Cocco**, *Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Franca Deriu**, *Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italia*

**Giampaolo Brichetto**, *Unità di riabilitazione, FISM, Genova, Italia*

**Maura Pugliatti**, *Università di Ferrara, Ferrara, Italia*

**Antonella Conte**, *Università La Sapienza, Roma, Italia*

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

**Francesco Patti**, *Università di Catania, Catania, Italia*

**Paolo Ragonese**, *Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia*

**Maria Luisa Piras**, *Presidio ospedaliero San Francesco, Nuoro, Italia*

**Sezioni AISM**, *Roma, Nuoro, Bologna, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le persone con sclerosi multipla (SM) potrebbero essere più suscettibili alle infezioni, al cancro e a patologie croniche rispetto alla popolazione generale non per la presenza della patologia in sé, ma in relazione all'utilizzo di alcune specifiche terapie o al grado di disabilità. In base alle conoscenze al momento disponibili, l'uso di molti farmaci modificanti la malattia (DMD) richiede un'attenzione particolare sulla possibilità di eventi infettivi o insorgenza di tumori o malattie croniche. In questa prospettiva, tra i bisogni clinici ancora insoddisfatti nelle persone con SM, si pone l'acquisizione di un quadro completo sullo stato di immunizzazione contro le principali malattie infettive e sul rischio di cancro e patologie croniche. Nonostante la rilevanza della medicina preventiva nel processo decisionale clinico, non ci sono studi in letteratura sull'aderenza di questi pazienti alle campagne di screening e vaccinazione in Italia. Lo scopo dello studio sarà quello di descrivere l'adesione alla medicina preventiva da parte delle persone con SM, indagando possibili differenze tra persone con e senza SM nell'accesso a vaccinazioni e screening. Inoltre, cercheremo di identificare, in entrambi i gruppi, le potenziali variabili correlate all'aderenza alla medicina pre-

ventiva, compresa l'influenza della pandemia Covid-19. Questo progetto, di 1 anno e prorogato per difficoltà nell'arruolare controlli, è concepito come uno studio multicentrico, osservazionale e retrospettivo, diviso in due parti. La prima è concepita come uno studio trasversale che arruolerà circa 1250 pazienti dai database di Centri clinici, Unità di Riabilitazione e sedi locali dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla del Nord, Centro e Sud Italia. Saranno arruolati pazienti di età superiore ai 25 anni con diagnosi confermata di SM. I dati saranno raccolti attraverso un questionario somministrato per telefono, previo consenso informato scritto. La seconda parte è concepita come uno studio caso-controllo, all'interno dello studio trasversale, che arruolerà un sottogruppo di 300 persone con SM (gruppo casi) e 300 senza SM, appaiate per sesso, età e area di residenza (gruppo controllo) per analizzare l'impatto della malattia e/o disabilità sull'accesso/aderenza alla medicina preventiva. La conoscenza dello stato di immunizzazione e del rischio di cancro e patologie croniche è fondamentale per la pratica clinica nella gestione dei nuovi DMD ma anche per la salute pubblica nel determinare l'eventuale necessità di percorsi di cura integrati mirati alle persone con SM.

## RISULTATI

Al momento il progetto è nella fase di arruolamento pazienti e raccolta dati tramite interviste telefoniche. Vista la difficoltà nel reperire controlli senza SM, stiamo arruolando nuovi centri clinici SM e nuove sezioni AISM.

Finora i casi arruolati sono 267, di cui il 69% sono donne ed il 56% ha una forma recidivante remittente e una disabilità lieve. Per quanto riguarda lo stile di vita, il 54% dei casi arruolati non ha mai fumato e il 50% non beve sostanze alcoliche, mentre solo il 44% dichiara di fare un'attività fisica sufficiente o più che sufficiente. Considerando gli screening oncologici programmati, nei soggetti con età superiore ai 50 anni, solo il 58% dichiara di eseguire lo screening coloretale, mentre la percentuale di donne che esegue la mammografia raggiunge l'88%. Fra le donne con età fra 25 e 64 anni, invece, il 94% di queste effettua il PAP test. Analizzando le vaccinazioni, solo il 28% dei casi

arruolati dichiara di effettuare la dose di richiamo antitetanica, mentre fra i soggetti con età superiore ai 65 anni, il 56% dichiara di effettuare la vaccinazione antinfluenzale e solo il 16% quella antipneumococcica.

## CONCLUSIONI

La scarsa presenza di casi con disabilità grave non ci permette di valutare l'adesione alla medicina preventiva nei soggetti più fragili, per cui nei prossimi mesi sarà necessario incrementare l'arruolamento di casi con determinate caratteristiche. Inoltre, il basso numero di controlli finora arruolati, non ci permette ancora di confrontare i dati dei casi con i rispettivi controlli.

I dati ottenuti finora sono abbastanza in linea con i dati in letteratura per la popolazione italiana, mostrando ancora una bassa aderenza allo screening per il tumore del colon retto e alle vaccinazioni raccomandate in età adulta/anziana.

# Description of adherence to the main preventive health campaigns of persons with multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Persons with multiple sclerosis (PwMS) might be more susceptible to infections and cancers and chronic diseases than general population, not because of the presence of the disease itself, but in relation to some specific therapies use or the degree of disability. Based on the currently available knowledge, the use of many disease-modifying drugs (DMDs) requires special attention to the possibility of infectious events or onset of cancer. In this perspective, a still unmet clinical need in PwMS is the acquisition of a complete picture of the immunization status against the main infectious diseases and the risk of cancer and other chronic diseases. Adherence to preventive pathways can reduce screening time for access to specific treatments, increase safety within complex therapies and reduce the risk of comorbidities. Despite of the relevance of preventive medicine in clinical decision making, there are no studies in literature on the adherence of these patients to screening and vaccination campaigns in Italy. The purpose of the study will be to describe the adherence to preventive medicine by PwMS, investigating possible differences between PwMS and people without MS (PwoMS) in the access to vaccinations and screenings. In addition, we will try to identify, in both groups, the potential variables correlated to preventive medicine adherence, including the influence of the Covid-19 pandemic. This 1-year project is conceived as a multicenter, observational and retrospecti-

ve study, divided in two parts. The first one is conceived as a cross-sectional study that will enroll approximately 1250 patients from databases of Clinical Centers, Rehabilitation Units and local branches of the Italian MS Society in Northern, Central and Southern Italy. Patients over 25 years of age with a confirmed diagnosis of MS will be enrolled. Data will be collected through a questionnaire administered by telephone, upon written informed consent. The second part is designed as a case-control study, that will enroll a subgroup of 300 PwMS (case group) and 300 PwoMS, matched by gender, age and residence area (control group) to analyze the impact of disease and/or disability to access/adherence to preventive medicine. Knowledge of immunization status and chronic diseases risk is critical for clinical practice in the management of new DMDs but also for public health in determining the possible need for integrated care pathways targeted to PwMS.

## RESULTS

Actually, we are enrolling cases and controls from several MS clinical centers and local branches of AISM. Due to the difficult to find controls, we are involving in the study other MS clinical centers, and we are promoting the project among local branches of AISM to increase the number of participants. At the moment, we have analyzed 267 cases of which 69% were females, 56% with a relapsing-retting form and mostly with a mild disability. Regarding lifestyle,

54% of enrolled cases never smoked and 50% did not drink alcohol, whereas only 44% of subjects reported doing enough or more than enough physical activity. Considering programmed cancer screening, in subjects aged more than 50 years, only 58% declared to do colorectal screening, whereas the percentage of women reporting to do mammography reached 88%. Among women aged less than 64 years, 94% declared to do PAP test. Regarding vaccinations, only 28% declared to do booster dose against tetanus, and, among subjects aged more than 65 years, 56% of them did flu vaccines and only 16% did vaccine against pneumococcus.

## CONCLUSIONS

The scarce presence of cases with severe disabilities does not allow us to evaluate the adherence to preventive medicine in the most fragile subjects, so in the coming months it will be necessary to increase the enrolment of cases with certain characteristics. Furthermore, the low number of controls enrolled so far does not yet allow us to compare cases with their respective controls.

The data obtained so far are quite in line with literature for the Italian population, showing a low adherence to colorectal cancer screening and to the recommended vaccinations in adult/elderly age.



**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2022 e l'ammontare di 45.000 €**  
FISM Research special project funded in 2022 and the amount of € 45,000

---

**SM progressiva**

Progressive MS

---

# Sviluppo di un brevetto per nuovi modulatori di GPR17, un recettore chiave nei processi di rimielinizzazione



## Maria Pia Abbracchio\*, Ivano Eberini\*\*

\*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

\*\*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Marta Fumagalli, Davide Lecca, Davide Marangon, Chiara Parravicini, Simona Saporiti, Omar Ben Mariem**

## PREMESSE E OBIETTIVI

L'avvento dei farmaci immunomodulatori per la sclerosi multipla (SM) ha finalmente permesso di fare affidamento su terapie modificanti la malattia (DMT), che hanno notevolmente migliorato la prognosi della SM e la qualità di vita dei pazienti. Questo tipo di terapia può ridurre il numero di ricadute e rallentare il danno che si accumula nel tempo, riducendo il numero di pazienti che progrediscono verso la forma irreversibile della malattia. Tuttavia, la DMT non rappresenta una cura, poiché le lesioni già esistenti non possono essere riparate e non è favorita la rimielinizzazione.

Il potenziale innovativo di questo progetto risiede nello sviluppo di farmaci nuovi e originali con attività pro-mielinizzante, che agiscono con un meccanismo d'azione completamente diverso, ovvero, interagendo specificamente con GPR17, un recettore chiave espresso dai progenitori degli oligodendrociti, cellule del sistema nervoso centrale e coinvolto in modo cruciale nel loro differenziamento in cellule mature produttrici di mielina.

## RISULTATI

In precedenza, abbiamo identificato una molecola estremamente selettiva per GPR17 (galinex), che è stata in grado di ritardare l'insorgenza dei sintomi della malattia in un modello sperimentale SM (encefalomielite autoimmune sperimentale). Per questa molecola e per la sua famiglia di appartenenza è stato depositato un brevetto d'uso terapeutico per la SM da FISM e UNIMI. Galinex è stato poi scelto come prototipo per sviluppare nuove molecole bioattive. Questo progetto quindi si è focalizzato sul completamen-

to di uno studio preclinico, analizzando le proprietà chimico-fisiche e biologiche di un insieme di cinquanta nuove molecole, selezionate in silico a partire da una libreria di composti chimicamente simili a galinex. Tutti i composti analizzati fanno parte quindi della stessa famiglia coperta dal nostro brevetto e sono potenzialmente in grado di riparare le lesioni mieliniche nei pazienti con SM.

I cinquanta composti sono stati selezionati attraverso studi in silico per prevedere l'affinità e la distribuzione nell'organismo. Venti delle cinquanta molecole sono state analizzate in vitro e le restanti trenta solo in silico, attraverso un approccio quantitativo che mette in relazione la struttura della molecola con la sua attività biologica. Per identificare le molecole più promettenti, sulle quali proseguire gli studi, abbiamo anche applicato un metodo innovativo che identifica i composti con la maggiore selettività per il bersaglio e quindi una ridotta propensione ad interagire con altre proteine, riducendo al minimo effetti aspecifici, potenzialmente tossici, collaterali o imprevisti.

Combinando i risultati in silico e quelli in vitro, sono state identificate due molecole con un profilo farmacologico e farmacocinetico promettenti, e con una buona selettività per GPR17.

## CONCLUSIONI

Il prossimo obiettivo di questo progetto sarà quindi quello di completare la caratterizzazione delle due molecole identificate in modelli in vivo di SM, per avvicinarci allo sviluppo di farmaci ad attività rimielinizzante. Prevediamo che questi ligandi vengano utilizzati anche in combinazione con i DMT già disponibili, in modo da ottenere un effetto

sinergico. Infatti, la mielinizzazione promossa da GPR17 è profondamente inibita dall'infiammazione, che può invece essere contrastata dai farmaci immunomodulatori.

L'uso di tali terapie combinate dovrebbe anche consentire una riduzione clinica delle dosi di DMT, riducendo così gli effetti collaterali, che sono spesso associati alla loro somministrazione. Ciò comporterà migliori tollerabilità e

prognosi e un'ulteriore riduzione della progressione della malattia fino a una possibile inversione della progressione della SM, che finora non è mai stata possibile.

Infine, ci aspettiamo che queste molecole possano essere attive in altre malattie del sistema nervoso caratterizzate da demielinizzazione.

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

### INTRODUCTION AND AIMS

The introduction of disease modifying drugs (DMTs) with immunomodulatory activity greatly improved both MS prognosis and patients' quality of life. Even though DMTs can reduce the number of relapses and slow down the damage that accumulates over time, reducing the number of patients progressing to the irreversible form of the disease, they do not represent a cure for MS, since they cannot repair already existing lesions and do not foster the remyelination of new ones.

The novelty of this project is to develop new, original pro-myelinating drugs acting with a completely different mechanism of action, i.e., by specifically interacting with GPR17, a key receptor expressed by oligodendrocyte progenitors (OPCs) and crucially involved in their differentiation to mature myelinating cells.

### RESULTS

We have previously identified an extremely selective molecule (galinex) for GPR17, able to delay the onset of clinical symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of MS. FISM and UNIMI have patented the therapeutic use of this molecule and its chemical family.

Then, galinex has been selected as a lead compound to develop new bioactive molecules.

The present project is focused on the completion of a pre-clinical study, analysing chemico-physical and biological properties of a subset of 50 synthesized entirely new chemical entities selected in silico based on their similarity to galinex. All the analysed compounds belong to the same family that we have previously patented, and they have

reparative potential for myelin MS lesions. These 50 compounds have been analysed in silico to predict their affinity and their distribution in the organism. Twenty out of 50 molecules have been analysed in vitro, and the remaining 30 have been further analysed in silico with a quantitative approach that predict their biological activity based on their chemical structure. The most promising compounds, have been also selected using an innovative method able to identify the potential unwanted interactions with other proteins, thus reducing potentially aspecific, toxic, or adverse effects. Combining in silico and in vitro results, we have identified two molecules with promising pharmacological and pharmacokinetic profile, and a good selectivity for GPR17.

### CONCLUSIONS

Our next step is to univocally evaluate the remyelinating capability of the two selected molecules in vivo in mouse models of MS.

We expect these ligands to be also used in combination with the already available DMTs, likely reinforcing each other's action. Indeed, GPR17-promoted myelination is profoundly inhibited by inflammation, which can, instead, be counteracted by immunomodulatory drugs. Use of such combination therapies is also expected to enable physicians to reduce the doses of DMTs, thus ameliorating the side effects that are often associated to their administration. This will further result in better tolerability, better prognosis, further reduced disease progression and, possibly, in MS reversal, something that has never been possible so far. Finally, we expect these molecules to be active in other CNS diseases characterized by demyelination.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Daniele S, Saporiti S, Capaldi S, Pietrobono D, Russo L, Guerrini U, Laurenzi T, Kachoie E, Palazzolo L, Russo V, Abbracchio MP, Eberini I, Trincavelli ML. Functional Heterodimerization between the G Protein-Coupled Receptor GPR17 and the Chemokine Receptors 2 and 4: New Evidence. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 23;24(1):261
- Marangon D, Audano M, Pedretti S, Fumagalli M, Mitro N, Lecca D, Caruso D, Abbracchio MP. Rewiring of Glucose and Lipid Metabolism Induced by G Protein-Coupled Receptor 17 Silencing Enables the Transition of Oligodendrocyte Progenitors to Myelinating Cells. *Cells.* 2022 Aug 2;11(15):2369
- Angelini, J; Marangon, D; Raffaele, S; Lecca, D; Abbracchio, MP. The Distribution of GPR17-Expressing Cells Correlates with White Matter Inflammation Status in Brain Tissues of Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 27;22(9):4574. doi: 10.3390/ijms22094574
- Lecca D, Abbracchio MP, Fumagalli M. Purinergic Receptors on Oligodendrocyte Progenitors: Promising Targets for Myelin Repair in Multiple Sclerosis?. *Front Pharmacol.* 2021 Jan 27;11:629618. DOI: 10.3389/fphar.2020.629618
- Lecca D, Raffaele S, Abbracchio MP, Fumagalli M. Regulation and signaling of the GPR17 receptor in oligodendroglial cells. *Glia.* 2020 Oct;68(10):1957-1967. doi: 10.1002/glia.23807
- Parravicini C, Lecca D, Marangon D, Coppolino GT, Daniele S, Bonfanti E, Fumagalli M, Ravaglia L, Martini C, Gianazza E, Trincavelli ML, Abbracchio MP, Eberini I. Development of the first in vivo GPR17 ligand through an iterative drug discovery pipeline: A novel disease-modifying strategy for multiple sclerosis. *PLoS One.* 2020 Apr 22;15(4):e0231483. doi: 10.1371/journal.pone.0231483. eCollection 2020
- Capelli D, Parravicini C, Pochetti G, Montanari R, Temporini C, Rabuffetti M, Trincavelli ML, Daniele S, Fumagalli M, Saporiti S, Bonfanti E, Abbracchio MP, Eberini I, Ceruti S, Calleri E, Capaldi S. Surface Plasmon Resonance as a Tool for Ligand Binding Investigation of Engineered GPR17 Receptor, a G Protein Coupled Receptor Involved in Myelination. *Front Chem.* 2020 Jan 10;7:910. doi: 10.3389/fchem.2019.00910. eCollection 2019
- Coppolino GT, Marangon D, Negri C, Menichetti G, Fumagalli M, Gelosa P, Dimou L, Furlan R, Lecca D, Abbracchio MP. Differential local tissue permissiveness influences the final fate of GPR17-expressing oligodendrocyte precursors in two distinct models of demyelination. *Glia.* 2018 May;66(5):1118-1130. doi: 10.1002/glia.23305
- Fumagalli M, Lecca D, Coppolino GT, Parravicini C, Abbracchio MP. Pharmacological Properties and Biological Functions of the GPR17 Receptor, a Potential Target for Neuro-Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1051:169-192. doi: 10.1007/5584\_2017\_92. Review
- Bonfanti E, Gelosa P, Fumagalli M, Dimou L, Viganò F, Tremoli E, Cimino M, Sironi L, Abbracchio MP. The role of oligodendrocyte precursor cells expressing the GPR17 receptor in brain remodeling after stroke. *Cell Death Dis.* 2017 Jun 8;8(6):e2871. doi: 10.1038/cddis.2017.256
- Boccazzi M, Lecca D, Marangon D, Guagnini F, Abbracchio MP, Ceruti S. A new role for the P2Y-like GPR17 receptor in the modulation of multipotency of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Purinergic Signal.* 2016 Dec;12(4):661-672

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2013 e l'ammontare di 401.805 €**  
FISM Research special project funded in in 2013 and the amount of € 401,805

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



## Antonio Bertolotto, Marco Capobianco

Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano (TO), Italia

COLLABORATORI/COLLABORATORS

Paola Valentino, Francesca Montarolo, Fabiana Marnetto

### PREMESSE E OBIETTIVI

Le biobanche sono organizzazioni senza scopo di lucro che gestiscono secondo criteri di qualità la raccolta, la conservazione e la distribuzione di campioni biologici e dati associati, nel rispetto dei diritti dei partecipanti. Lo scopo delle biobanche è consentire lo sviluppo di studi scientifici di alta qualità: la scarsa riproducibilità dei risultati della ricerca e della loro ricaduta nella pratica clinica è infatti dovuta alla mancanza di rigorosi metodi pre-analitici e analitici. Dal 2013 il Centro Regionale di Riferimento per la Sclerosi Multipla (CRESM, AOU San Luigi Gonzaga) lavora per trasformare il proprio archivio di campioni biologici in una biobanca strutturata. A gennaio 2020, è stata istituita la Biobanca del CRESM (BBCRESM), con il riconoscimento Istituzionale da parte dell'AOU San Luigi Gonzaga (delibera n°56/2020). BBCRESM ha un regolamento e una governance definita che comprende una struttura organizzativa e procedure che regolano ogni attività della biobanca. La documentazione (opuscolo informativo e Consenso Informato, Valutazione dell'Impatto sulla Privacy, Procedure Operative Standard e il documento MDTA per il trasferimento dei campioni e dati associati) è stata approvata dalla direzione e dal Comitato Etico dell'AOU San Luigi Gonzaga. BBCRESM è la prima biobanca italiana focalizzata sulla Sclerosi Multipla (SM) e altre malattie neurologiche ed è sostenuta principalmente da FISM. BBCRESM è la prima biobanca piemontese entrata a far parte delle reti italiana e internazionale per il biobancaggio (BBMRI.it e BBMRI-ERIC). L'obiettivo finale di questo progetto è istituire e mantenere una biobanca sulla SM per promuovere la ricerca in questo campo.

### RISULTATI

Lo scopo della BBCRESM è conservare e distribuire cam-

pioni e dati di qualità. Oggi il riferimento per il sistema qualità di una biobanca è la norma ISO20387, che definisce requisiti generali e specifici relativi alle risorse, ai processi e ai controlli di qualità di campioni e dati. L'accesso ai campioni e dati è una fase cruciale nell'attività delle biobanche: BBCRESM ha precedentemente definito specifiche procedure di accesso ai campioni. Recentemente sono stati introdotti alcuni documenti operativi per standardizzare e favorire la distribuzione dei campioni: il "Modulo di richiesta disponibilità di campioni e dati" (in italiano e inglese), il "Modulo per la valutazione del progetto di ricerca" da parte del Comitato Scientifico e la versione aggiornata del modulo MDTA per il trasferimento di campioni al di fuori dell'Unione Europea (in italiano e inglese). Un altro aspetto del sistema qualità è assicurare la competenza e la formazione del personale: BBCRESM è coinvolta in diversi gruppi di lavoro e attività di formazione organizzate dalle infrastrutture per il biobancaggio BBMRI e ESBB. Infine, è ovviamente fondamentale assicurare la qualità di campioni e dati, nel rispetto degli standard attuali. BBCRESM ha quindi definito ed esegue regolarmente procedure di valutazione della qualità su campioni biologici, dati associati e sulla strumentazione. Attualmente, 1.630 partecipanti sono coinvolti nella BBCRESM, fra cui circa 1.480 pazienti e 150 individui sani. Nel 2022 sono stati coinvolti 130 nuovi partecipanti. Ogni partecipante ha firmato il consenso informato della BBCRESM, fondamentale per la partecipazione: le informazioni fornite garantiscono infatti un coinvolgimento trasparente e consapevole. Inoltre, BBCRESM è attualmente impegnata in iniziative e attività di formazione finalizzate alla delicata questione del corretto coinvolgimento dei soggetti minori. Attualmente nella biobanca del CRESM sono raccolti 7.740 campioni di siero, 5.518

di plasma, 5.883 di RNA, 4.934 di sangue intero, 4.249 di cellule del sangue e 794 di liquido cefalorachidiano. Ogni campione biologico è conservato in provette identificate con un codice a barre, secondo i requisiti di privacy e qualità previsti per le biobanche.

I campioni sono raccolti principalmente da pazienti con SM (6.301 campioni), con NMOSD (717 campioni), con altre malattie neurologiche (115 campioni) e da partecipanti sani (156 campioni). In particolare, per quanto riguarda i pazienti con SM, i campioni sono stati raccolti in diverse fasi della malattia: alla puntura lombare diagnostica (797 campioni), prima dell'inizio del trattamento (964 campioni), durante il follow-up (6.178 campioni) e durante le recidive cliniche (76 campioni). La BBCRESM è coinvolta in diversi progetti e collaborazioni con enti pubblici di ricerca e aziende farmaceutiche. Nel 2022 sono stati distribuiti più di 400 campioni e dati associati per studi sulla correlazione fra EBV e SM (Dr. Mechelli, Università San Raffaele e Dr. Gran, Università di Nottingham) e per uno studio sui miRNA microgliali in pazienti con SM (Dr. Bianco, BrainDTEch). Inoltre, sono attualmente in fase di approvazione altre richieste dell'Università di Torino, dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, dell'IRCCS San Martino di Genova e dell'azienda Sanofi. Infine, l'attività e la sostenibilità di una Biobanca sono legate alla sua visibilità. Nel 2022, BBCRESM si è adoperata per pubblicizzare

e divulgare la propria attività in ambito scientifico e sociale attraverso la produzione di un breve video (<https://youtube.com/watch?v=NclXnp8FjNY&feature=share>), tramite la registrazione sulla piattaforma delle malattie rare Orphanet e l'aggiornamento delle sue pagine web sui siti di BBMRI e dell'istituto di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi (NICO):

- [https://directory.bbmri-eric.eu/#/biobank/bbmri-eric-ID:IT\\_1557158178220168](https://directory.bbmri-eric.eu/#/biobank/bbmri-eric-ID:IT_1557158178220168)
- <https://www.nico.ottolenghi.unito.it/Ricerca/Gruppi-di-ricerca/Neurobiologia-clinica>
- <https://bit.ly/3SOOhjQ>

## CONCLUSIONI

Grazie al supporto di FISM, BBCRESM è la prima biobanca italiana focalizzata sulla SM riconosciuta a livello istituzionale. L'attività della Biobanca del CRESM è basata su standard e metodi rigorosi, dalla raccolta alla condivisione di campioni e dati, consentendo di sviluppare una ricerca di qualità, nel rispetto dei soggetti coinvolti. Rappresenta quindi un servizio fondamentale per supportare e accelerare gli studi di ricerca nel campo della SM e delle malattie neurologiche e autoimmuni.

Il Contatto della biobanca:

[biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it](mailto:biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it)

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Biobanks are nonprofit organizations, which manage collection, storage, and distribution of high quality biospecimens and associated data, in the respect of participants' rights. Their aim is to enable and accelerate high-quality scientific studies; indeed, lack of rigor in pre-analytical and analytical methods represents the main cause of poor reproducibility and implementation of research results into clinical practice.

Since 2013, the Regional Reference Multiple Sclerosis Center (CRESM, AOU San Luigi Gonzaga) is working to transform its archive of biological samples into a structured biobank. In January 2020, CRESM Biobank (BBCRESM) received formal Institutional commitment by AOU San Luigi Gonzaga (deliberation n°56/2020). BBCRESM has a specific Regulation and a defined governance including an organizational structure and procedures that regulate all biobanking operations. All documentation (SOPs, informed consent, informative

leaflet, regulation and the MDTA document for material and data transfer) was approved by AOU San Luigi direction and Ethical Committee. BBCRESM is the first Italian biobank focused on Multiple Sclerosis (MS) and other neurological diseases and is mainly supported by FISM. It is the first biobank in Piedmont included in the national and international Infrastructures for biobanking (BBMRI.it and BBMRI-ERIC).

The ultimate goal of this project was to establish and maintain a MS biobank to boost research studies in this field.

## RESULTS

BBCRESM aims to collect and distribute high quality samples and data. To date, the reference for the quality system of a biobank is the ISO20387 standard, which includes general and specific requirements about resources, processes and quality controls of samples and data. The access policy is a crucial step in the biobanking activity; BBCRESM has previously defined its specific access policy.

Recently BBCRESM implemented several operative documents to standardize and favor data and sample sharing: the “Request form for availability of samples and data” (in Italian and English), the “Form for the evaluation of research project” by Scientific committee and the updated version of MDTA for transfer of samples and data also outside of the European Union (in Italian and English).

Another main item of quality system of a biobank is to guarantee the competence of its personnel:

BBCRESM is involved in several working groups and training activities proposed by the main international network for biobanking BBMRI and ESBB.

Finally, the ultimate purpose of a biobank is guaranteeing the quality of its specimens and data in compliance with current quality standards. Accordingly, BBCRESM defined and routinely performs quality assessment procedures on biological samples, associated data and its equipment. Currently, 1,630 participants are involved in BBCRESM: they include about 1,480 patients and 150 healthy individuals. In year 2022, 130 new participants were involved. Each participant signed BBCRESM informed consent, a crucial act in the process of participant engagement: the provided information ensure transparent and aware consensus and engagement. Further, BBCRESM is currently engaged in ELSI initiatives and workshops aiming at the sensitive issue of the correct involvement of minor subjects. Currently, BBCRESM includes 7,740 serum samples, 5,518 plasma samples, 5883 RNA samples, 4,934 whole blood samples, 4,249 blood cells samples and, 794 cerebrospinal fluid samples. Each biospecimen is stored in small volume bar-coded tubes, according to privacy and quality requirements. Samples are collected mainly from patients with MS (6,301 samples), with NMOSD (717 samples), with other neurological diseases (115 samples) and from healthy participants (156 samples). BBCRESM includes MS patients' samples collected at different disease stages: at diagnostic lumbar puncture (797 samples), before treatment start (964 samples), during follow-up (6,178 samples) and during clinical relapses (76 samples). BBCRESM has been

contacted and involved in several collaborations with public and private research institutions and pharma-companies. In 2022, more than 400 samples and associated data have been distributed for studies assessing the correlation between EBV and MS (Dr. Mechelli, University San Raffaele and Dr. Gran, University of Nottingham) and for a validation study of microglial miRNA in MS patients (Dr. Bianco, BrainDTech). In addition, other requests from University of Turin, ISS of Rome, IRCCS San Martino of Geneva and Sanofi are currently under approval. Finally, the exposure and visibility of a Biobank is crucial for its activity and sustainability. Therefore, BBCRESM worked also to publicize its activity in scientific and social fields through the production of a short video (<https://youtube.com/watch?v=NclXnp8FjNY&feature=share>), the registration of BBCRESM on the Orphanet platform for rare diseases and the update of its webpages on BBMRI's and Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO)'s websites:

- [https://directory.bbmri-eric.eu/#/biobank/bbmri-eric-ID:IT\\_1557158178220168](https://directory.bbmri-eric.eu/#/biobank/bbmri-eric-ID:IT_1557158178220168)
- <https://www.nico.ottolenghi.unito.it/Ricerca/Gruppi-di-ricerca/Neurobiologia-clinica>
- <https://bit.ly/3SOOhjQ>

## CONCLUSIONS

Thanks to FISM support, BBCRESM is the first institutional Italian biobank focused on MS and part of BBMRI network. BBCRESM is increasingly contributing to MS research, by collecting, storing and distributing high quality samples and associated data, based on strict quality methods, to enable data sharing and results reproducibility, in the respect of involved subjects. A network of biobanks focused on MS would improve the excellence of FISM funded high quality research.

The biobank contact:

[biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it](mailto:biobanca.cresm@sanluigi.piemonte.it)



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Martire S\*, Valentino P\*, Marnetto F, Mirabile L, Capobianco M, Bertolotto A. *The impact of pre-freezing storage time and temperature on gene expression of blood collected in EDTA tubes* Mol Biol Rep. 2022 Mar 12. doi: 10.1007/s11033-022-07320-5
- Valentino P, Malucchi S, Martire S, Bava CI, Capobianco MA, Bertolotto A. *sNFL applicability as additional monitoring tool in natalizumab extended interval dosing regimen for RRMS patients.* Mult Scler Relat Disord. 2022 Sep 14;67:104176. doi: 10.1016/j.msard.2022.104176
- Valentino P, Malucchi S, Martire S, Bava CI, Capobianco MA, Bertolotto A. *sNFL applicability as additional monitoring tool in Natalizumab Extended Interval Dosing regimen for RRMS patients.* Multiple Sclerosis Journal Volume 28, Issue 3\_suppl:ECTRIMS 2022, p 1006-1007
- Bava C. "Biobanking for Advanced Scientific Research: our experience at BBCRESM\_FENS video contest 2022
- Malucchi S, Valentino P, Marnetto F, Bava C, Martire S Bertolotto A, Capobianco MA . *Applicability of sNFL in Multiple Sclerosis as Additional Measure to Monitor Treatments in Clinical Practice and Implications in NEDA-3 Evaluation (S19.001)* Neurology May 03, 2022
- Carta S, Dinoto A, Capobianco MA, Valentino P, Lo Re M, Chiodega V, Branger P, Audoin B, Aboab J, Papeix C, Collongues N, Kerschen P, Zephir H, Creange A, Bourre B, Flanagan EP, Redenbaugh V, Arrambide G, Villaciers-Álvarez J, Cobo-Calvo A, Ferrari S, Marignier R, Mariotto S. *Profile of serum biomarkers in seronegative NMOSD.* Multiple Sclerosis Journal-Volume 28, Issue 3\_suppl:ECTRIMS 2022, p 1011-1012

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 e l'ammontare di 126.369 €**  
FISM Research special project funded in in 2020 and the amount of € 126,369

---

# **Verso nuovi trattamenti**

Towards  
new treatments

---

# Studio prospettico per valutare l'immunogenicità del vaccino antiSarsCov2 nella SM. CovaXiMS



## Maria Pia Sormani

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

### COLLABORATORI / COLLABORATORS

**Irene Schiavetti**

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

I seguenti centri italiani sono attivamente coinvolti nel progetto per l'arruolamento dei pazienti con SM e la raccolta dei dati clinici

*The following Italian centres are actively involved in the project for enrolling MS patients and collecting clinical data*

- Ospedale Policlinico San Martino IRCCS, Genova, Italia
- Ente Ospedaliero Ospedali Galliera, Genova, Italia
- Ospedale Padre Antero Micone, Sestri Ponente, Genova, Italia
- Ospedale Lavagna (Genova), Italia
- Ospedale Sant'Andrea, La Spezia, Italia
- Ospedale San Paolo, Savona, Italia
- Ospedale Santa Corona di Pietra Ligure (Savona), Italia
- Ospedale Civile di Imperia, Imperia, Italia
- FISM - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla
- ASST Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italia
- Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli, Italia
- Unità Clinica di Ricerca, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università Tor Vergata, Roma, Italia
- Centro Malattie Demielinizzanti, U.O. Neurologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italia
- Centro Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Policlinico G. Rodolico, Catania, Italia
- Fondazione Istituto G.Giglio, Cefalù
- Az. Ospedaliera Sant'Andrea, Roma, Italia
- Clinica Neurologica, DSNRO Università Federico II di Napoli
- Centro Sclerosi Multipla, ASST, Crema, Italia
- Ospedale Franz Tappeiner, Merano (BZ), Italia
- Ospedale Humanitas, IRCCS, Rozzano (MI), Italia
- Ambulatorio Malattie Demielinizzanti, UO Neurologia Ospedale di Città di Castello, Italia
- ASST Cremona, Italia
- Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Italia
- Ospedale Binaghi, Cagliari, Italia
- Ospedale Fabrizio Spaziani Frosinone Asl, Frosinone, Italia
- Ausl della Valle d' Aosta c/o Ospedale Umberto Parini, Aosta, Italia
- Regina Montis Regalis Hospital, Mondovì (CN), Italia
- Dipartimento Scienze Cliniche e Biologiche - SSD patologie neurologiche specialistiche - Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano (TO), Italia
- Clinica neurologica e malattie neurometaboliche, Università degli Studi di Siena, Italia
- Neurologia 2 Careggi, Firenze, Italia
- Centro Sclerosi Multipla Policlinico Umberto I, Roma, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza, Università di Roma, Roma, Italia



L'Unità Biostatistica del Dipartimento della Salute, Università degli Studi di Genova, è coinvolta nel coordinamento del progetto, nell'attività di gestione dei dati e nell'analisi statistica. Il Laboratorio di Autoimmunologia, IRCCS, Ospedale Policlinico S.Martino di Genova, si occupa della processazione dei campioni di sangue e analisi di laboratorio.

*The Biostatistic Unit of Department of Health Sciences - University of Genoa is involved in coordinating the project, in data management activity and statistical analysis.*

*The autoimmunology laboratory, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino (Genoa) is involved in blood sample processing and laboratory testing.*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Lo studio CovaXIMS ha tre obiettivi principali: 1. analizzare il livello di immunizzazione all'infezione da SARS-CoV-2 nei pazienti con SM vaccinati, in base alla loro esposizione ai diversi trattamenti. 2. Valutare la sicurezza del vaccino globalmente in tutti i pazienti e per ciascun gruppo di trattamento separatamente. 3. Valutare l'eventuale incidenza di Covid-19 nei pazienti con SM che hanno ricevuto la vaccinazione.

La definizione di caso per la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) è stata fatta secondo quanto riportato dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC).

I pazienti adulti con SM vaccinati con il vaccino anti-SARS-CoV-2 in Italia sono stati inclusi nello studio solo dopo aver fornito il loro consenso informato scritto. I dati sono stati raccolti in modo prospettico: tutte le persone con SM sono state sottoposte a un prelievo di sangue poco prima della vaccinazione. Successivamente sono state invitate al Centro SM per una visita neurologica di routine e per un prelievo di sangue a un mese dalla seconda dose, prima della terza dose e un mese dopo la terza dose. Nel caso in cui la terza dose non fosse stata eseguita, è stata prevista solo una visita con prelievo di sangue a nove mesi dalla seconda dose di vaccino.

La storia clinica e terapeutica di malattia, la presenza di comorbidità, le infezioni e le vaccinazioni recenti, le variabili demografiche e l'anamnesi di Covid (se presente) sono state raccolte durante la visita neurologica e inserite in una piattaforma web dedicata, che raccoglie anche i risultati delle analisi dei campioni di sangue.

I pazienti, inoltre, sono stati seguiti nell'anno successivo per verificare l'eventuale infezione da SARS-Cov-2 e i potenziali eventi avversi.

## RISULTATI

Ad oggi, il progetto ha coinvolto 37 centri italiani, 31 dei quali hanno arruolato 1919 pazienti con SM che hanno eseguito un primo ciclo vaccinale completo per la SARS-Cov2 e in trattamento con diverse terapie.

La prima analisi eseguita nel luglio 2021 su 780 pazienti

arruolati ha dimostrato che al termine della seconda dose di vaccino i livelli di anticorpi dei pazienti in trattamento con ocrelizumab, fingolimod e rituximab sono significativamente ridotti rispetto ai pazienti non trattati.

Inoltre, la vaccinazione con mRNA-1273 ha determinato un livello di anticorpi circa tre volte superiore rispetto al vaccino BNT162b2.

I livelli anticorpali delle terapie anti-CD20 sono correlati al tempo trascorso dall'ultima infusione, e il tempo medio dall'ultima infusione è stato significativamente più alto per i pazienti in trattamento con rituximab rispetto a quelli in trattamento con ocrelizumab.

Un'analisi successiva si è concentrata sulle infezioni breakthrough. 1705 pazienti hanno ricevuto due dosi di vaccino m-RNA. Tra questi, durante il follow-up sono state registrate 131 infezioni da Covid-19 (33 durante l'ondata Delta e 98 durante l'ondata Omicron). La probabilità di essere infettati durante l'ondata Delta risulta associata ai livelli di anticorpi SARS-CoV-2 misurati quattro settimane dopo la seconda dose di vaccino con una riduzione significativa per i casi Omicron.

Inoltre, la terza dose ha ridotto il rischio di infezione durante l'ondata Omicron. Questi dati hanno dimostrato che il rischio di infezioni da SARS-CoV-2 è principalmente associato a livelli ridotti di risposta immunitaria umorale specifica per il virus.

## CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questi studi suggeriscono che nei pazienti affetti da SARS-CoV-2 il trattamento con anti-CD20 e con fingolimod ha portato a una ridotta risposta umorale ai vaccini SARS-CoV-2 a base di mRNA.

Poiché l'mRNA-1273 favorisce livelli di anticorpi superiori rispetto al BNT162b2, questo vaccino può essere preferibile per i pazienti in trattamento con anti-CD20 o fingolimod.

Combinando questi dati con quelli sulla risposta immunitaria cellulare ai vaccini e includendo il follow-up clinico, si potrà contribuire a definire meglio le strategie vaccinali più appropriate per la SARS-CoV-2 nel contesto dei DMT e della SM.

Inoltre, il tasso di infezioni breakthrough nei pazienti SM dipende dal livello di immunità umorale nei confronti del SARS-CoV-2, che è ridotto nei pazienti sottoposti a specifiche terapie e che diminuisce nel tempo.

La variante Omicron è risultata meno sensibile ai livelli di anticorpi e ha aumentato il tasso di rischio di infezione breakthrough nei pazienti MS. Tuttavia, sono necessarie coorti più ampie per comprendere il ruolo protettivo della vaccinazione contro forme gravi di Covid-19 nei pazienti SM sottoposti a diversi trattamenti, anche se sembra che

il tasso di infezioni che richiedono l'ospedalizzazione sia stato ampiamente ridotto dopo la vaccinazione, anche nei pazienti in terapia con anti-CD20 (con una risposta umorale compromessa alla vaccinazione).

È risultato inoltre che la protezione da Covid-19 aumenta dopo la terza dose di richiamo del vaccino. L'identificazione della frequenza, della gravità e dei fattori predisponenti delle infezioni da virus nei pazienti SM può informare su come proteggerli con dosi di richiamo anticipate di vaccini.

## A prospective study for the evaluation of immunogenicity of anti-SARS-CoV2 vaccines in patients with multiple sclerosis. CovaxiMS: Covid-19 vaccine in MS

### INTRODUCTION AND AIMS

The CovaXiMS study has three main objectives:

1. To analyse the level of immunisation against SARS-CoV-2 infection in vaccinated patients with multiple sclerosis (pwMS) according to their disease modifying treatment (DMT) exposure.
2. To assess the safety of the vaccine globally in all patients and in each DMT group separately.
3. To assess the possible incidence of Covid-19 in MS patients who received the vaccination.

The case definition for coronavirus disease 2019 (COVID-19) was made as reported by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Adult MS patients vaccinated with the anti-SARS-CoV-2 vaccine in Italia were included in the study only after providing their written informed consent. Data were collected prospectively: all people with MS underwent a blood sample just before vaccination. They were then invited to the MS Centre for a routine neurological examination and blood sampling one month after the second dose, before the third dose and one month after the third dose. In case the third dose was not performed, only a neurological visit with blood sampling was scheduled nine months after the second dose.

The clinical and therapeutic history of disease, presence of comorbidities, recent infections and vaccinations, demographic variables and Covid history (if present) were collected during the neurological examination and reported into a dedicated web platform, which also collects the results of blood sample analyses.

Patients were also followed up in the following year to check for SARS-Cov-2 infection and potential side effects.

### RESULTS

To date, the project has involved 37 Italian centres, 31 of which have enrolled 1919 MS patients who had undergone a first complete vaccination cycle for SARS-Cov2 and were treated with different DMTs. The first analysis performed in July 2021 on 780 enrolled patients showed that at the end of the second vaccine dose the antibody levels of patients treated with ocrelizumab, fingolimod and rituximab were significantly reduced compared to untreated patients.

Moreover, vaccination with mRNA-1273 resulted in approximately three times higher antibody levels than with the BNT162b2 vaccine. Antibody levels of anti-CD20 therapies correlated with the time since the last infusion, and the median time since last infusion was significantly higher for patients on rituximab than for those on ocrelizumab. A subsequent analysis focused on breakthrough infections. 1705 patients received 2 doses of m-RNA vaccine. Of these, 131 Covid-19 infections were recorded during follow-up (33 during the Delta wave and 98 during the Omicron wave). The probability of being infected during the Delta wave was associated with SARS-CoV-2 antibody levels measured four weeks after the second vaccine dose, and the protective role of antibodies was maintained throughout the follow-up, with a significant reduction for Omicron cases.

Furthermore, the third dose reduced the risk of infection during the Omicron wave. These data showed that the risk of SARS-CoV-2 infection is mainly associated with reduced levels of virus-specific humoral immune response.

## CONCLUSIONS

In conclusion, the results of these studies suggest that in SARS-CoV-2 patients, anti-CD20 and fingolimod treatment led to a reduced humoral response to mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines.

As mRNA-1273 elicits higher antibody levels than BN-T162b2, this vaccine may be considered preferentially for patients treated with anti-CD20 or fingolimod.

Combining these data with those on cellular immune response to vaccines and including clinical follow-up will help to better define the most appropriate vaccine strategies for SARS-CoV-2 in the context of DMTs and MS.

Furthermore, the rate of breakthrough infections in DMT-treated patients depends on the level of humoral immunity against SARS-CoV-2, which is reduced in DMT-spe-

cific patients and decreases over time. The Omicron variant was less sensitive to antibody levels and increased the risk rate of breakthrough infection in DMT patients. However, larger cohorts are needed to understand the protective role of vaccination against severe forms of Covid-19 in MS patients undergoing different DMTs, although it appears that the rate of infections requiring hospitalisation was largely reduced after vaccination, even in patients on anti-CD20 therapy (with an impaired humoral response to vaccination). Protection from Covid-19 was also found to increase after the third booster dose of the vaccine. Identifying the frequency, severity, and predisposing factors of virus infections in MS patients may inform how to protect them with earlier booster doses of vaccines.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Sormani MP, Inglese M, Schiavetti I, Carmisciano L, Laroni A, Lapucci C, Da Rin G, Serrati C, Gandoglia I, Tassinari T, Perego G, Bricchetto G, Gazzola P, Mannironi A, Stromillo ML, Cordioli C, Landi D, Clerico M, Signoriello E, Frau J, Ferrò MT, Di Sapio A, Pasquali L, Ulivelli M, Marinelli F, Callari G, Iodice R, Liberatore G, Caleri F, Repice AM, Cordera S, Battaglia MA, Salvetti M, Franciotta D, Uccelli A; CovaXiMS study group on behalf of the Italian Covid-19 Alliance in MS. Effect of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in MS patients treated with disease modifying therapies. *EBioMedicine*. 2021 Oct;72:103581. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103581
- Sormani MP, Schiavetti I, Inglese M, Carmisciano L, Laroni A, Lapucci C, Visconti V, Serrati C, Gandoglia I, Tassinari T, Perego G, Bricchetto G, Gazzola P, Mannironi A, Stromillo ML, Cordioli C, Landi D, Clerico M, Signoriello E, Cocco E, Frau J, Ferrò MT, Di Sapio A, Pasquali L, Ulivelli M, Marinelli F, Pizzorno M, Callari G, Iodice R, Liberatore G, Caleri F, Repice AM, Cordera S, Battaglia MA, Salvetti M, Franciotta D, Uccelli A; CovaXiMS study group. Breakthrough SARS-CoV-2 infections after COVID-19 mRNA vaccination in MS patients on disease modifying therapies during the Delta and the Omicron waves in Italia. *EBioMedicine*. 2022 Jun;80:104042. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104042
- Sormani MP. Third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in MS patients treated with disease modifying therapies. Oral presentation at 38th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS 2022) Amsterdam, The Netherlands, 26 - 28 October 2022, presented by Schiavetti I

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2021 e l'ammontare di 94.500 €**  
FISM Research special project funded in 2021 and the amount of €. 94,500

# Impatto dei fattori genetici e dei farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla sulle risposte immunitarie cellulari e umorali dopo la vaccinazione contro il Sars-Cov-2



## Francesco Cucca

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari; Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Monserrato (CA), Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**M. Laura Idda, Maristella Pitzalis, Maristella Steri, Marco Masala, Magdalena Zoledziewska, Francesca Viridis, Maria Giuseppina Marini, Maura Mingoia, Annalisa Loizedda, Maria Grazia Piras, Monia Lobina, Sandra Lai, Antonella Mulas, Edoardo Fiorillo, Valeria Orrù, Marcella Devoto, Valeria Lodde, Giuseppe Delogu, Matteo Floris**

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

**Sergio Uzzau**, *Unità di Microbiologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italia*

**Roberto Zarbo, Gabriele Farina, Silvy Pilotto, Paolo Castiglia, Paola Chessa, Paolo Solla**, *Unità di Neurologia, Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Sperimentali, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italia*

**Eleonora Cocco, Jessica Frau, Lorena Lorefice, Marzia Fronza, Daniele Carmagnini, Elisa Carta**, *Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari e Centro Regionale Sclerosi Multipla, Cagliari, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La malattia da coronavirus 2019 (Covid-19) è una malattia infettiva che ha colpito oltre 678 milioni di persone in tutto il mondo e ha causato 6,8 milioni di morti (14.02.2023). Il 27 dicembre 2020 è iniziata la campagna europea di vaccinazione contro il Covid-19. I vaccini hanno mostrato notevoli profili di efficacia e sicurezza nella popolazione generale, ma la loro efficacia in individui a più alto rischio di infezione, come i pazienti affetti da sclerosi multipla (SM) sottoposti a terapie modificanti la malattia (DMT), è ancora oggi in corso studio. I protocolli attuali somministrano due iniezioni a distanza di 3-12 settimane, con un picco del titolo anticorpale a 7-10 giorni dopo la seconda iniezione; ad oggi sono state approvate anche le dosi di richiamo. Gli obiettivi di questo progetto sono di valutare lo sviluppo e il declino delle risposte cellulari e umorali specifiche post-vaccino in relazione ai regimi terapeutici a cui i pazienti con SM si sottopongono, e identificare se i fattori genetici e ambientali influenzano lo sviluppo, durata e de-

clino della risposta immunitaria cellulare e umorale contro il vaccino in pazienti con SM stratificati per terapia.

Il monitoraggio delle risposte immunitarie alla vaccinazione SARS-CoV-2 e la sua efficacia clinica nel tempo nei pazienti con SM trattati con DMT contribuirà a stabilire le strategie ottimali per garantire un'adeguata protezione contro il Covid-19 senza compromettere il controllo della malattia autoimmune.

## RISULTATI

Abbiamo analizzato gli anticorpi anti-SARS-CoV-2-S e anti-SARS-CoV-2-N in pazienti con SM in tre diversi momenti dopo la vaccinazione con il vaccino a mRNA BN-T162b2: 4 settimane dopo la seconda dose (T1), 6 mesi dopo la seconda dose (T2) e 4 settimane dopo la terza dose (T3, primo richiamo).

Le differenze in pazienti con SM stratificati per terapia sono state valutate mediante un opportuno modello statistico; sono stati analizzati anche il contributo di età, sesso,

fumo, Expanded Disability Status Scale (EDSS) e precedente infezione da SARS-CoV-2.

Abbiamo osservato che 4 settimane dopo la seconda dose (T1), i pazienti trattati con natalizumab (NAT), teriflunomide (TER), azatioprina (AZA), fingolimod (FTY), ocrelizumab (OCR) e rituximab (RTX) hanno mostrato una riduzione significativa delle risposte umorali rispetto ai pazienti non trattati (UNT). Non abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa nella risposta tra i pazienti trattati con gli altri farmaci analizzati (dimetil fumarato (DMF), interferone (IFN), alemtuzumab (ALE) e glatiramer acetato (GA)) e UNT. Inoltre, l'età avanzata, il sesso maschile, l'EDSS e il fumo attivo erano significativamente associati a titoli anticorpali più bassi contro SARS-CoV-2.

Alla seconda dose (T2) abbiamo osservato differenze significative nei livelli di anticorpi anti-S tra i pazienti UNT e quelli trattati con FTY, OCR e RTX. L'età, il fumo e l'EDSS hanno continuato a mostrare effetti coerenti con T1, riduzione dei livelli di anticorpi anti-SARS-CoV-2 diretti contro la proteina S nei pazienti più anziani, nei pazienti con EDSS ridotto e nei fumatori. Infine, dopo la terza dose (T3), abbiamo osservato un livello significativamente inferiore di anticorpi anti-S solo nei pazienti trattati con FTY e OCR, rispetto a UNT. A T3 nessuna delle covariate ha mostrato un ulteriore effetto sulla produzione di anticorpi anti-SARS-CoV-2. La discrepanza tra i tre punti temporali analizzati potrebbe essere spiegata dall'effetto della vaccinazione nel tempo e/o dalla discrepanza nella dimensione del campione, significativamente inferiore a T2 e T3 rispetto a T1. L'esposizione naturale a SARS-CoV-2 aumenta i livelli di anticorpi anti-S post-vaccinazione rispetto ai pazienti che non hanno manifestato l'infezione da SARS-CoV-2. Complessivamente, valutando la mediana del livello di anticorpi anti-S ad ogni time-point (T1-T2-T3), abbiamo scoperto che 6 mesi dopo la seconda dose di vaccinazione BNT162b2 (T2), i livelli di anti-S diminuiscono di 3 volte rispetto a T1. Inoltre, in linea con i rapporti precedenti, è stata osservata una forte up-regolazione dei livelli sierici di anticorpi anti-S un mese dopo il booster (T3).

Infine, abbiamo deciso di valutare il rischio di Covid-19 nei pazienti che ricevono terapie anti-CD20 (OCR e RTX)

e FTY, che sono associate a risposte umorali ridotte al vaccino, valutando il numero di pazienti con SM che sono andati incontro ad infezione con Covid-19 5 mesi dopo il richiamo. È interessante notare che l'infezione da Covid-19 era più comune nei pazienti che ricevevano terapie anti-CD20 e FTY rispetto a quelli che ricevevano altre terapie o UNT. La maggiore incidenza di malattia nel gruppo trattato con anti-CD20 e FTY è coerente con i titoli anticorpali più bassi osservati in queste categorie. Tuttavia, il numero di individui considerati nella nostra analisi è piccolo, sarebbe quindi importante allargare la casistica al fine di validare tali risultati.

Le attività in corso, che prevediamo di portare a termine nei prossimi mesi sono l'analisi della risposta immunitaria cellulare e l'impatto della variabilità genetica sulle risposte al vaccino Covid-19.

## CONCLUSIONI

Abbiamo osservato che la risposta umorale al vaccino BNT162b2 è significativamente influenzata dalle differenti DMT cui i pazienti con SM si sottopongono, nonché da altri fattori come la precedente infezione al SARS-CoV-2, l'età, il sesso e l'abitudine al fumo.

I risultati qui presentati si riferiscono alla valutazione degli effetti della prima vaccinazione anti-Sars-Cov2 seguita da una singola dose di richiamo del vaccino ed è stata completata diversi mesi fa; andrebbero quindi collocati in un contesto più attuale basato sui nuovi rapporti che sottolineano l'efficacia e la sicurezza che il richiamo aggiuntivo - già approvato - fornisce sia alla popolazione generale che alle persone affette da SM.

Alla luce di questi risultati e del miglioramento delle risposte immunitarie al vaccino dopo infezione naturale e/o la prima dose di richiamo del vaccino, è probabile che l'uso di ulteriori richiami rafforzerà ulteriormente le risposte immunitarie contro SARS-CoV-2 dei pazienti affetti da SM sotto qualsiasi DMT. Riteniamo che questi risultati siano importanti per definire strategie mirate per prevenire le forme severe di COVID-19 nei pazienti con SM.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) is an infectious disease which has affected over 678 million people worldwi-

de and caused 6.8 million deaths (14.02.2023).

On the 27th of December 2020, the European vaccination campaign against the coronavirus started. The vaccines

have shown considerable efficacy and safety profiles in the general population, but their efficacy in individuals at higher risk of infection, such as Multiple Sclerosis patients undergoing disease-modifying therapies (DMTs), is not yet well understood. Current protocols administer two shots three-twelve weeks apart, with antibody titer peaking seven-ten days after the second shot. Booster doses have also been approved. However, the duration of long-term antibody titer and cellular memory are still under investigation.

The goals of this project are to assess the development and decline of post-vaccination Sars-Cov-2 specific cellular and humoral responses, in relation to the underlying therapeutic regimens in patients with MS, and to identify if genetic and environmental factors influence the development, duration and decline of cellular and humoral immune response against Sars-Cov-2 vaccine in patients with MS stratified by disease therapy.

Monitoring immune responses to SARS-CoV-2 vaccination and its clinical efficacy over time in MS patients treated with certain DMTs will help to establish the optimal strategies to ensure adequate Covid-19 protection without compromising control of underlying autoimmune disease activity.

## RESULTS

We analyzed anti-SARS-CoV-2-S and anti-SARS-CoV-2-N antibody in MS patients at three different time points following BNT162b2 mRNA vaccination: 4 weeks after the second dose (T1), 6 months after the second dose (T2) and 4 weeks after the third dose (T3, booster).

The differences between groups of patients defined by therapy, were assessed by an appropriate statistical model; the contribution of age, sex, smoke, Expanded Disability Status Scale (EDSS) and previous SARS-CoV-2 infection were also analyzed.

We observed that 4 weeks after the second dose (T1), MS patients treated with natalizumab (NAT), teriflunomide (TER), azathioprine (AZA), fingolimod (FTY), ocrelizumab (OCR), and rituximab (RTX) showed significantly lower humoral responses as compared to untreated patients (UNT). We did not observe a statistically significant difference in response between patients treated with the other drugs analyzed (dimethyl fumarate (DMF), interferon (IFN), alemtuzumab (ALE) and glatiramer acetate (GA)) and UNT. In addition, older age, male sex, EDSS and active smoking were significantly associated with lower antibody titers against SARS-CoV-2.

At the second dose (T2) we observed significant differences in anti-S antibody levels between UNT patients and those treated with FTY, OCR and RTX. Age, smoke, and EDSS continued to show consistent effects at T2, reduced postvaccination levels of anti-SARS-CoV-2 antibodies directed against the S protein in older patients as well as in patients with reduced EDSS and smokers. Finally, after the third dose (T3), we observed a significantly lower level

of anti-S antibodies only in MS patients treated with FTY and OCR, compared to UNT. At T3 none of the covariates showed an additional effect on anti-SARS-CoV-2 antibodies production. The discrepancy between the three time points analyzed could be explained by the effect of vaccination over time and by the discrepancy in sample size, significantly smaller at T2 and T3 as compared to T1. Natural exposure to SARS-CoV-2, increases postvaccination anti-S antibodies levels as compared to patients which didn't experience SARS-CoV-2 infection.

Overall, evaluating the median of anti-S antibody level at each timepoint (T1-T2-T3), we found that 6 months after the second dose of BNT162b2 vaccination (T2), the levels of anti-S decrease 3-fold compared to T1. Furthermore, in line with previous reports, a strong upregulation in serum anti-S antibody levels was observed a month after the BNT162b2 booster (T3).

Finally, we decided to evaluate the risk of COVID-19 in patients receiving anti-CD20 (OCR and RTX) and FTY therapies, which are associated with reduced humoral responses to vaccine, by assessing the number of MS patients who became positive for Covid-19 five months after the booster. Interestingly, Covid-19 infection was more common in patients receiving anti-CD20 and FTY therapies than in those receiving other therapies or untreated. The higher incidence of disease in the group treated with anti-CD20 and FTY is consistent with the lower antibody titers observed in these categories of DMT. However, the number of individuals considered in our analysis is small; thus, it will be important to consider evidence from larger case series.

Ongoing activities are the analysis of cellular immune response to SARS-CoV-2 vaccine at different time points stratified by therapy and the impact of genetic variability on Covid-19 vaccine responses.

## CONCLUSIONS

We observed that humoral response to BNT162b2 is significantly influenced by the specific DMTs followed by patients, as well as by other factors such as previous SARS-CoV-2 infection, age, sex, and smoking status.

The results presented here refer to the evaluation of the effects of the initial anti-Sars-Cov2 vaccination followed by a single booster dose of the vaccine completed several months ago and should therefore be placed in a more current context. Indeed, new reports suggest that additional booster - already approved - improves protection without affecting safety.

Given these findings and the improved immune responses to vaccine after prior infection and/or the first booster dose of vaccine, it is likely that the use of further booster shots will further reinforce immune responses against SARS-CoV-2 of MS patients under any DMT. We believe that these results are important to inform targeted strategies to prevent clinically relevant Covid-19 in MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Pitzalis M, Idda ML, Lodde V, Loizedda A, Lobina M, Zoledziewska M, Viridis F, Delogu G, Pirinu F, Marini MG, Mingoia M, Frau J, Lorefice L, Fronza M, Carmagnini D, Carta E, Orrù V, Uzzau S, Solla P, Loi F, Devoto M, Steri M, Fiorillo E, Floris M, Zarbo IR, Cocco E, Cucca F. Effect of Different Disease-Modifying Therapies on Humoral Response to BNT162b2 Vaccine in Sardinian Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2021 Dec 9;12:781843. doi:10.3389/fimmu.2021.781843
- Idda ML, Pitzalis M, Lodde V, Loizedda A, Frau J, Lobina M, Zoledziewska M, Viridis F, Delogu G, Marini MG, Mingoia M, Masala M, Lorefice L, Fronza M, Carmagnini D, Carta E, Pilotto S, Castiglia P, Chessa P, Sergio U, Farina, Solla P, Steri M, Devoto M, Fiorillo E, Floris M, Zarbo IR, Cocco E, Cucca F. Cross-sectional analysis of the humoral response after SARS-CoV-2 vaccination in Sardinian Multiple Sclerosis patients, a follow-up study. *Front Immunol.* In press.

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 con rinnovo nel 2021 e l'ammontare di 400.000€**  
FISM Research special project funded in 2020 with extension in 2021 and the amount of € 400,000

# Un approccio basato sulla genetica per identificare farmaci per la SM: sviluppo di brevetti dei geni candidati



## Francesco Cucca

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari; Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Monserrato (CA), Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Edoardo Fiorillo, Matteo Floris, Laura Idda, Marco Masala, Mara Marongiu, Stefania Olla, Andrea Angius, Valeria Orrù, Mauro Pala, Clelia Peano, Maristella Pitzalis, Carlo Sidore, Maristella Steri, Magdalena Zoledziewska**

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

**Eleonora Cocco**, *Responsabile del Centro regionale per la cura della Sclerosi Multipla e Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Rachael Bashford-Rogers**, *University of Oxford, Oxford, UK*

**Kylie James**, *Sanger Center, Cambridge, UK*

**Nicola Segata**, *Centro di Metagenomica Computazionale, Università degli Studi Trento, Trento, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Numerose evidenze suggeriscono che alla base della sclerosi multipla (SM) vi sia un processo autoimmune in cui il sistema immunitario attacca e distrugge erroneamente la mielina, la guaina che riveste i prolungamenti (assoni) delle cellule nervose del sistema nervoso centrale (SNC), causandone la perdita (demielinizzazione). Le nostre evidenze preliminari suggeriscono che in tale processo, siano coinvolte delle cellule immunitarie provenienti dal tessuto linfatico intestinale (GALT). Questo implica che tali cellule, per raggiungere il SNC partendo dal GALT debbano passare attraverso il sangue circolante. Una migliore comprensione di quali cellule del GALT siano coinvolte e con quali meccanismi arrivino al SNC, è importante per lo sviluppo di terapie specifiche, più sicure ed efficaci. DNA, RNA e proteine sono le molecole di base dei processi biologici. Il DNA contiene le informazioni necessarie per controllare tutti i processi cellulari. L'RNA viene copiato dal DNA ("trascritto") e può fungere da guida per la produzione di proteine o regolare esso stesso vari processi biologici. Lo studio dell'intero corredo genetico (genoma) e dei trascritti (trascrittoma) può essere utile per chiarire il ruolo dell'immunità GALT nella SM. Questo progetto di ricerca si basa su queste premesse e principi.

Il nostro approccio è quello di identificare innanzitutto

i siti del genoma (loci) associati (coinvolti) nel controllo genetico dei livelli ematici delle cellule GALT e di vedere se questi coincidono ("co-localizzano") con quelli che influenzano il rischio di sviluppare la SM. Per individuare i geni causalmente coinvolti in queste associazioni genetiche coincidenti è necessario studiare anche il trascrittoma. Nel contesto di questa proposta i geni causali saranno quelli i cui livelli di RNA trascritto sono influenzati dagli stessi loci (eQTL) che influenzano anche i livelli di cellule GALT e il rischio di SM.

Inoltre, in migliaia di individui sani, ma geneticamente e immunologicamente a rischio di sviluppare la SM, studieremo se esista una relazione causale tra alcune cellule immunitarie GALT presenti nel sangue periferico e la composizione di microrganismi simbiotici presenti nell'intestino (definiti complessivamente microbiota).

Infine, per dimostrare quali cellule GALT passando attraverso il sangue periferico raggiungano il SNC, preleveremo le cellule del liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti al momento della diagnosi e analizzeremo il loro trascrittoma mediante la recente tecnologia del "sequenziamento dell'RNA a singola cellula" (scRNAseq) e definiremo l'esatta composizione delle cellule immuni presenti nel CSF. Poiché scRNAseq consente di analizzare anche la sequenza dei recettori dei linfociti B (BCR) e T (TCR), avremo

a disposizione una sorta di codice a barre molecolare delle singole cellule linfocitarie, che ci permetterà di tracciarle nel sangue periferico. Nel complesso, questo progetto contribuirà a chiarire aspetti chiave del processo alla base della SM e potrebbe avere importanti implicazioni per il suo trattamento e persino per la prevenzione.

## RISULTATI

È stata condotta una analisi sistematica per identificare i loci associati al controllo genetico dei livelli delle cellule nel sangue circolante (comprese le cellule GALT) e successivamente identificare quelli co-localizzanti con i loci associati al rischio di SM.

A questo scopo, in 3.757 volontari abbiamo misurato mediante citoflorimetria a flusso, 792 tratti di cellule e identificato 10 loci co-localizzanti sia con i tratti cellulari che con la predisposizione per la SM (CD40, IL2RA, la regione genetica CTLA4-CD28, BACH2, IFI30, ELMO1, TNFRSF14, regione LOC101928295, JAZF1, ATP6V1G3, regione PTPRC) [Orrù et al., Nature Genetics 2020].

Inoltre, in 2.924 volontari abbiamo misurato 2.392 tratti specifici dell'immunità mucosale. Con l'analisi dei primi 792 tratti già esaminati abbiamo identificato ulteriori 6 loci co-localizzanti sia con i tratti cellulari che con la predisposizione alla SM (MIR181A1HG, ZBP2-GSDMB, EPS15L1, FOXP1 e i già citati CD40 e BAFF). Per studiare il coinvolgimento del microbiota nella SM, sono stati sequenziati i DNA di microrganismi presenti nel materiale fecale (metagenoma), di 2.688 volontari sani comprendenti sia quelli geneticamente e immunologicamente a rischio di sviluppare la SM che quelli geneticamente e

immunologicamente protetti per l'insorgenza della SM. Le analisi preliminari in un sottogruppo di 768 volontari hanno identificato specifiche componenti del metagenoma differentemente abbondanti tra individui protetti ed individui a rischio per MS. Per studiare lo scambio di cloni di cellule GALT tra il liquido cerebrospinale (CSF) e il sangue periferico, stiamo sequenziando cellule isolate da CSF di pazienti all'esordio di SM, mediante sequenziamento RNA a singola cellula (scRNAseq) abbinato alla profilazione del TCR e BCR. Abbiamo raccolto e criopreservato cellule CSF e cellule mononucleate del sangue periferico di 30 pazienti SM e in 8 pazienti, le cellule CSF sono stati profilate utilizzando due tecnologie differenti (un sottogruppo di 4 pazienti con la tecnologia 10X Chromium e i restanti con BD Rhapsody). Analisi di comparazione della composizione cellulare sono in corso.

## CONCLUSIONI

In conclusione, tutte le attività del progetto sono in corso ed abbiamo finora analizzato, per ogni attività, dati preliminari in sottogruppi rappresentativi della totale casistica caratterizzata. Abbiamo identificato associazioni genetiche correlate sia ai tratti dell'immunità mucosale sia all'insorgenza della SM, e preliminari risultati che supportano l'ipotesi che definiti livelli tassonomici siano correlati con genotipi estremi per geni GALT in grado di modificare il rischio di SM. Nel complesso, i risultati ottenuti in questo progetto rafforzeranno le relazioni di causa-effetto con l'insorgenza della malattia e apriranno nuove strategie per il suo trattamento e la sua prevenzione.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

A large body of evidence suggests that the underlying cause of multiple sclerosis (MS) is an autoimmune process in which the immune system attacks and mistakenly destroys myelin, the sheath that covers the extensions (axons) of nerve cells in the central nervous system (CNS), causing their loss (demyelination). Our preliminary evidence suggests that gut-associated lymphoid tissue (GALT) immune cells are involved in this process. This implies that these cells must pass through the circulating blood to reach the CNS from the GALT. A better understanding of which GALT cell subtypes are involved and the mechanisms by which they reach the CNS is important for the development of specific, safer and more effective therapies. DNA, RNA and proteins are the basic molecules of biological processes. DNA contains the information needed to control all cellular processes. RNA is copied from

DNA ('transcribed') and can act as a guide for protein production or regulate various biological processes itself. Studying the entire genetic make-up (genome) and transcripts (transcriptome) may help to clarify the role of GALT immunity in MS. This research project is based on these premises and principles.

Our approach is to first identify genomic locations (loci) that are involved in the genetic control of blood levels of GALT cells, and to see if they co-localized with those that influence the risk of developing MS. To identify the genes causally involved in these co-localized genetic associations, it is also necessary to study the transcriptome. In the context of this proposal, the causative genes will be those whose transcribed RNA levels are influenced by the same loci (eQTLs) that influence GALT cell levels and MS risk.

Furthermore, in thousands of healthy individuals who are genetically and immunologically at risk of developing MS,

we will investigate whether there is a causal relationship between certain GALT immune cells present in the peripheral blood and the composition of symbiotic microorganisms present in the gut (collectively referred to as the microbiota).

Finally, to demonstrate what GALT cells that pass through the peripheral blood reach the CNS, we will collect cerebrospinal fluid (CSF) cells from patients at the time of diagnosis and analyse their transcriptome using the new technology of single-cell RNA sequencing (scRNAseq) to define the exact composition of immune cells present in the CSF. Since scRNAseq also allows us to analyse the receptor sequence of B lymphocytes (BCR) and T lymphocytes (TCR), we will have a kind of molecular barcode of the individual lymphocyte cells, allowing us to track them in the peripheral blood. Overall, this project will help to clarify key aspects of the process underlying MS and could have important implications for its treatment and even prevention.

## RESULTS

A systematic analysis was carried out to identify loci associated with the genetic control of cell levels in the circulating blood (including GALT cells), and then to identify those that co-localize with loci associated with MS risk.

For this purpose, in 3,757 subjects, we measured 792 cell traits by flow cytometry and identified 10 loci that co-localized with both cell traits and MS susceptibility (CD40, IL2RA, the CTLA4-CD28 genetic region, BACH2, IFI30, ELMO1, TNFRSF14, the LOC101928295 region, JAZF1, ATP6V1G3, the PTPRC region) [Orrù et al., Nature Genetics 2020].

In addition, we measured 2,392 specific traits of mucosal immunity in 2,924 subjects. By analyzing the first 792 features already examined, we identified a further 6 that co-localized with both cell traits and MS

susceptibility (MIR181A1HG, ZPBP2-GSDMB, EPS15L1, FOXP1 and the aforementioned CD40 and BAFF)

To investigate the involvement of the microbiota in MS, the DNA of microorganisms present in the faeces of 2,688 healthy volunteers was sequenced (metagenome), including those genetically and immunologically at risk of developing MS and those genetically and immunologically protected against the onset of MS. Preliminary analyses in a subset of 768 subjects identified specific metagenomic components that were differentially abundant between protected individuals and those at risk for MS.

To study the exchange of GALT cell clones between cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood, we are sequencing cells isolated from CSF of patients at the onset of MS by single-cell RNA sequencing (scRNAseq) combined with TCR and BCR profiling. We collected and cryopreserved CSF cells and peripheral blood mononuclear cells from 30 MS patients, and in 8 patients CSF cells were profiled using two different technologies (a subset of 4 patients using 10X Chromium technology and the remainder using BD Rhapsody). Comparative analyses of cell composition are ongoing.

## CONCLUSION

In summary, all project activities are ongoing and to date we have analyzed preliminary data for each activity in subgroups that are representative of the entire characterized case series. We have identified genetic associations related to both mucosal immune traits and MS onset, and preliminary results support the hypothesis that defined taxonomic levels correlate with extreme genotypes for GALT genes that may modify MS risk. Overall, the results of this project will strengthen the cause-and-effect links with the onset of the disease and open up new strategies for its treatment and prevention.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Sidore C, Orrù V, Cocco E, Steri M, Inshaw JR, Pitzalis M, Mulas A, McGurnaghan S, Frau J, Porcu E, Busonero F, Dei M, Lai S, Sole G, Viridis F, Serra V, Poddie F, Delitala A, Marongiu M, Deidda F, Pala M, Floris M, Masala M, Onengut-Gumuscu S, Robertson CC, Leoni L, Frongia A, Ricciardi MR, Chessa M, Olla N, Lovicu M, Loizedda A, Maschio A, Mereu L, Ferrigno P, Curreli N, Balaci L, Loi F, Ferrel LA, Pilia MG, Pani A, Marrosu MG, Abecasis GR, Rich SS, Colhoun H, Todd JA, Schlessinger D, Fiorillo E, Cucca F, Zoledziewska M. PRF1 mutation alters immune system activation, inflammation, and risk of autoimmunity. *Mult Scler.* 2021 Aug;27(9):1332-1340
- Orrù V, Steri M, Sidore C, 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, Abecasis GR, Floris M, Pala M, Schlessinger D, Fiorillo E, Cucca F. Complex genetic signatures

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2020 con rinnovo nel 2021 e l'ammontare di 400.000€**  
FISM Research special project funded in 2020 with extension in 2021 and the amount of € 400,000

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



## Federica Eva Esposito

Centro Sclerosi Multipla e Unità di Neurologia, Laboratorio di Genetica Umana delle Malattie Neurologiche, Istituto di Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Laura Ferrè, Elisabetta Mascia, Melissa Sorosina, Silvia Santoro, Ferdinando Clarelli, Lucia Moiola, Vittorio Martinelli, Massimo Filippi**

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

**Giorgio Valentini**, Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia  
**David Brassat, Roland Liblau, Béatrice Pignolet**, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France  
**Philip De Jager**, Columbia University, New York, USA

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nell'ultimo decennio abbiamo assistito ad 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 variabile da paziente a paziente, rendendo difficile l'identificazione del trattamento più adatto al singolo soggetto fin dalle primissime fasi della malattia. Ad oggi la risposta ai farmaci viene valutata in corso di terapia sulla base della comparsa di nuovi sintomi e/o nuove lesioni alla risonanza magnetica nucleare (RMN). In questo contesto si inserisce il nostro studio, che si propone di studiare il rapporto tra la componente genetica e la propensione a rispondere a un determinato trattamento. Tale approccio potrebbe portare 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 in base anche al suo profilo genetico.

Un precedente studio condotto presso il nostro centro SM, sempre grazie al supporto di FISM, ha consentito di identificare dei marcatori genetici associati alla risposta al trattamento con fingolimod partendo da una coorte di 255 pazienti con SMRR. Al fine di validare i risultati precedentemente ottenuti, abbiamo arruolato un secondo gruppo di 98 pazienti SMRR italiani, trattati con fingolimod e seguiti per almeno 2 anni presso il Centro Sclerosi Multipla dell'Ospedale San Raffaele di Milano; abbiamo inoltre creato una collaborazione con il Prof. Philip De Jager, della Columbia University di New York, che ha contribuito al progetto con 136 pazienti americani seguiti presso il

Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) e con il Prof. David Brassat, del Centro Ospedaliero Universitario di Tolosa (Tolosa, Francia), che ha contribuito con 81 pazienti SMRR francesi.

Un totale di 442 soggetti è stato incluso nello studio. I pazienti delle coorti coinvolte nel progetto sono stati classificati in base alla risposta alla terapia, considerando lo stato NEDA (No Evidence of Disease Activity). In particolare, sono stati classificati come NEDA i soggetti che non avevano ricadute cliniche, nuove lesioni o lesioni attive alla RM e progressione di malattia dopo 2 anni dall'inizio del trattamento. Come ulteriore parametro per valutare la risposta al trattamento, è stata considerato l'intervallo di tempo che intercorre tra l'inizio del trattamento e il verificarsi della prima ricaduta di malattia (TTFR).

I soggetti inclusi nello studio sono stati genotipizzati e oltre 600'000 varianti genetiche distribuite su tutto il genoma sono state testate; nessuna variante è risultata essere significativamente associata allo stato NEDA, mentre se si considera l'outcome TTFR abbiamo identificato tre varianti associate: rs9371376 ( $p=2.20 \times 10^{-8}$ ) sul cromosoma 6, rs185664173 ( $p=5.67 \times 10^{-7}$ ) sul cromosoma 19 e rs6124768 ( $p=1.42 \times 10^{-7}$ ) sul cromosoma 20.

Utilizzando le informazioni presenti in diversi database pubblici abbiamo approfondito le caratteristiche delle regioni del genoma in cui le varianti identificate mappano. Queste ulteriori analisi hanno suggerito un loro possibile ruolo nella modulazione dell'espressione di alcuni geni, tra cui i più interessanti sono TIAM2, TFB1M, PLTP e CD40.

## RISULTATI

Basandoci su queste evidenze abbiamo deciso di confermare in vitro la diversa espressione di TIAM2, TFB1M, PLTP e CD40 in base al genotipo, andando a validare l'effetto di modulazione dell'espressione genica (eQTL) già evidenziato in vitro. Abbiamo inoltre effettuato la stimolazione delle cellule con la forma attiva di fingolimod e/o con uno stimolo pro-infiammatorio (concanavalina A) in cellule mononucleate derivate da sangue periferico (PBMC) provenienti da persone con (MS) e senza SM (HC).

Questi esperimenti hanno consentito di confermare l'effetto eQTL di rs6124768, infatti nei PBMC di soggetti portatori dell'allele A l'espressione di CD40 è significativamente più alta rispetto ai soggetti con genotipo GG ( $p=0.012$ ); inoltre, abbiamo notato che anche nei soggetti con genotipo AG per la variante rs9371376 l'espressione di TIAM2 è più alta comparata ai soggetti con genotipo GG, seppure questo effetto non sia statisticamente significativo. Non abbiamo osservato differenze di espressione tra HC e MS.

Nella seconda parte dell'esperimento abbiamo verificato l'espressione dei sopracitati geni in seguito alla stimolazione in vitro; i risultati ottenuti mostrano un aumento significativo dell'espressione di TIAM2 e CD40 in seguito allo stimolo pro-infiammatorio; al contrario PLTP mostra una riduzione dell'espressione in seguito allo stesso stimolo. Non ci sono evidenze che fingolimod modifichi l'espres-

sione dei geni analizzati, questo fa supporre che probabilmente la diversa risposta al trattamento non sia dovuta tanto ad un effetto del farmaco sulla modulazione dei geni testati ma che sia piuttosto dovuta alla loro differente espressione basale dovuta al genotipo.

In parallelo all'analisi di associazione, grazie alla collaborazione con il Prof. Giorgio Valentini dell'Università degli Studi di Milano, abbiamo utilizzato un approccio di machine learning per costruire un modello di predizione di risposta alla terapia con fingolimod. Nel presente progetto, avendo a disposizione tre coorti aggiuntive, abbiamo deciso di aggiornare il modello sviluppato in precedenza e di utilizzare delle coorti indipendenti per l'addestramento, la validazione e il test del modello predittivo sviluppato. La presente analisi ha permesso di identificare un set di dati clinici e genetici che hanno una discreta capacità predittiva (AUROC=0.71).

## CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio ha permesso di identificare dei possibili marcatori di risposta alla terapia con fingolimod; lo studio approfondito dell'effetto di questi marcatori potrebbe portare in futuro all'identificazione di meccanismi non ancora noti alla base della risposta al farmaco. Inoltre, grazie al presente studio è stato possibile sviluppare un modello predittivo con una moderata capacità di predizione della risposta a fingolimod.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Over the past decade, we have seen a significant increase in the therapies available for patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS). However, the response to therapies is highly unpredictable and varies from patient to patient, making it difficult to identify the most suitable treatment for each subject from the very early stages of the disease. Nowadays treatment response is evaluated during therapy and it is based on the appearance of new symptoms and/or new lesions on nuclear magnetic resonance imaging (MRI). The present study is aimed to assess the relationship between the genetic component and the propensity to respond to a treatment. This approach could lead to an improvement of the MS patient management, allowing to define if a patient will respond to the chosen drug based also on his genetic profile, in the context of a treatment optimization.

A previous study conducted at our MS center, supported

as well by FISM, allowed us to identify genetic markers associated to the response to fingolimod in a cohort of 255 patients with RRMS. In order to validate the previously obtained results, we enrolled a second group of 98 Italian RRMS patients, treated with fingolimod and followed for at least 2 years at the Multiple Sclerosis Center of the San Raffaele Hospital in Milan; we also developed a collaboration with Prof. Philip De Jager, of Columbia University in New York, who contributed to the project with 136 American patients followed at the Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) and with Prof. David Brassat, of the University Hospital Center of Toulouse (Toulouse, France), who contributed with 81 French RRMS patients.

A total of 442 subjects were included in the study. All the patients were classified based on response to therapy, considering the NEDA (No Evidence of Disease Activity) status. In particular, the subjects who did not have clinical relapses, new lesions or active lesions on MRI and dise-

ase progression after 2 years from treatment start were classified as NEDA. As an additional parameter to assess the response to treatment, the interval of time between the treatment start and the occurrence of the first relapse (TTFR) was considered.

The subjects included in the study were genotyped and over 600,000 genetic variants distributed throughout the genome were tested; none of them revealed to be significantly associated with NEDA status, while for the TTFR we identified three variants: rs9371376 ( $p= 2.20 \times 10^{-8}$ ) on chromosome 6, rs185664173 ( $p= 5.67 \times 10^{-7}$ ) on chromosome 19 and rs6124768 ( $p= 1.42 \times 10^{-7}$ ) on chromosome 20.

Taking advantage of the availability of public databases, we tried to explore the characteristics of the regions of the genome where the identified variants mapped. These analyses suggested a possible role of the identified signals in modulating the expression of some genes, among which the most interesting are TIAM2, TFB1M, PLTP and CD40.

## RESULTS

Based on this evidence we decided to confirm in vitro the different expression of TIAM2, TFB1M, PLTP and CD40 according to the genotype (expression quantitative trait loci, eQTL) already known in vitro. We also stimulated with fingolimod and/or proinflammatory stimuli (concanavalin A) peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from people with (MS) or without MS (HC).

We confirmed the eQTL effect of rs6124768 on CD40, indeed in PBMC from A-carriers the CD40 expression is significantly higher compared to the GG genotype ( $p=0.012$ ); moreover, cells with rs9371376AG genotype showed an higher expression of TIAM2 compared to cells

of individuals with GG genotype, although not statistically significant. No difference between MS and HC was found. In the second part of the experiments, we evaluated the expression of above-mentioned genes after stimulation with the active form of fingolimod and/or pro-inflammatory molecules; the results showed a significantly higher expression of TIAM2 and CD40 after the proinflammatory stimulus, while the PLTP expression was lower. Fingolimod did not modify the expression of any of the tested genes, these results suggest that probably the different response to treatment is explained by genotypes and not by the modulation of the gene expression induced by fingolimod. In parallel to the association analysis, thanks to the collaboration with Prof. Giorgio Valentini of the University of Milan, a machine learning approach was used to build a predictive model of response to fingolimod. In the present project, given the availability of three additional cohorts, we decided to update the previously developed model and to use independent cohorts for the training, the validation and the testing of the developed predictive model. The present analysis allowed us to identify a set of clinical and genetic data that have a discrete predictive capacity (AUROC = 0.71).

## CONCLUSIONS

In conclusion, the present study allowed the identification of possible markers of response to fingolimod therapy; the in-depth study of the effect of these markers could lead, in the future, to the identification of mechanisms, not yet known, involved in fingolimod treatment response. Moreover, thanks to the present study we developed a predictive model with a moderate accuracy in the prediction of response to fingolimod.



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

- Ferrè L, Clarelli F, Pignolet B, Mascia E, Frasca M, Santoro S, Sorosina M, Bucciarelli F, Moiola L, Martinelli V, Comi G, Liblau R, Filippi M, Valentini G, Esposito F. *Combining Clinical and Genetic Data to Predict Response to Fingolimod Treatment in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients: A Precision Medicine Approach. J. Pers. Med.* 2023, 13, 122
- 7th European Academy of Neurology (EAN 2021), Virtual Conference June 19-22, 2021
- 54th European Human Genetics Conference (ESHG 2021), Virtual Conference August 28-31, 2021
- WCN ROME 2021+ 25th WORLD CONGRESS OF NEUROLOGY, Fully Virtual, October 3-7, 2021

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2021 per un ammontare di 50.000€**  
FISM Research special project funded in 2021 and the amount of € 50,000

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



## Giuseppe Matarese\* e Luca Battistini\*\*

\*Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IEOS-CNR) c/o Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

\*\*IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

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

**Vincenzo Brescia Morra, Roberta Lanzillo**, Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

**Ciro Florio, Giorgia Teresa Maniscalco**, Centro Regionale per la diagnosi e cura della Sclerosi Multipla - AOU "Antonio Cardarelli", Napoli, Italia

**Diego Centonze**, Istituto Neurologico Mediterraneo, Neuromed, Pozzilli (IS), Italia

**Claudio Gasperini**, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale S. Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Marco Salvetti**, Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Dipartimento

di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

**Giacomo Lus**, Centro Sclerosi Multipla, II Clinica Neurologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La tolleranza immunologica verso gli antigeni self rappresenta un processo finemente regolato a diversi livelli. Diversi studi hanno mostrato che un ruolo chiave nel controllo di questi processi è svolto dallo stato nutritivo/energetico delle cellule del sistema immunitario. In questo contesto diversi dati sperimentali hanno mostrato che la restrizione calorica e il digiuno acuto sono in grado di migliorare l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), il modello murino di SM. Nonostante questa evidenza, non sono stati condotti studi specifici per stabilire a livello cellulare il meccanismo d'azione della restrizione calorica nel contesto dell'autoimmunità e della SM nell'uomo. Quindi, scopo di questo studio è quello di stabilire l'effetto di una lieve restrizione calorica sulla progressione e sull'attività della SM. Inoltre, poiché è stato dimostrato che la composizione del microbiota intestinale è fortemente influenzata dall'assunzione di alimenti "pro-infiammatori" come il latte vaccino e il glutine e che la rimozione di questi

alimenti è associata alla riduzione dell'infiammazione nelle malattie autoimmunitarie, come la malattia infiammatoria cronica intestinale (IBD) e il diabete giovanile autoimmune, lo scopo di questo progetto è anche capire l'effetto della restrizione calorica associata alla rimozione di alimenti specifici come il latte vaccino e il glutine sulla progressione della malattia.

## RISULTATI

Considerato che l'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'effetto della restrizione calorica sulla progressione della SM, al momento dell'arruolamento, a tutti i pazienti con SM è stata effettuata una visita nutrizionale ed è stato sviluppato un profilo nutrizionale specifico e personalizzato al fine di ridurre l'apporto calorico del paziente (restrizione calorica del 15-20% rispetto alle calorie medie normalmente consumate) con o senza l'eliminazione di cibi altamente infiammatori (glutine e latte vaccino). Un gruppo di pazienti con SM è stato assegnato al gruppo

di controllo che continua a seguire la normale alimentazione. Dopo l'arruolamento, è stato anche effettuato un prelievo di sangue da tutti i pazienti con SM inclusi nello studio per valutare la composizione e la percentuale delle diverse popolazioni del sistema immunitario e il numero e la funzione delle cellule T regolatorie, una sottopopolazione cellulare coinvolta nei meccanismi di tolleranza immunologica. I pazienti con SM vengono periodicamente monitorati dai nutrizionisti mediante impedenziometria per verificare l'aderenza al protocollo nutrizionale e ogni 6 mesi viene effettuato un prelievo di sangue per la valutazione degli effetti della restrizione calorica sull'assetto immuno-metabolico. Ad oggi abbiamo quasi terminato l'arruolamento di tutti i pazienti previsti nello studio che terminerà a giugno. Una volta arruolati, i pazienti saranno poi seguiti per 24 mesi per le successive visite di follow up. Al termine del periodo di follow up saranno analizzati gli andamenti sia dei dati clinici (EDSS, ricadute, numero di lesioni, etc) che molecolari e cellulari per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sulla progressione della malattia.

Questo studio fa anche parte del progetto Multiact per il coinvolgimento attivo dei pazienti con SM e del personale coinvolto nello studio (nutrizionisti, neurologi, ricercatori, psicologi, ecc.) nella ricerca connessa al progetto.

### CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio è comprendere l'effetto della restrizione calorica sulla progressione della SM e migliorare la progressione della malattia e l'efficacia dei trattamenti farmacologici di prima linea mediante restrizione calorica con o senza eliminazione di specifici alimenti altamente antigenici (glutine/latte) modulando lo stato metabolico dell'ospite. I dati ottenuti potrebbero contribuire ad ottenere maggiori conoscenze sulla patogenesi della malattia e sulla sua crescente prevalenza nei paesi più sviluppati. Inoltre, la comprensione dell'effetto della modulazione metabolica sulla patogenesi e progressione della SM potrebbe contribuire allo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici che associano approcci nutrizionali ai trattamenti di prima linea.

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

### INTRODUCTION AND AIMS

The immunological self tolerance is a finely regulated process. Several studies reported that a key role in the control of these processes is played by the nutritional/energetic state of immune system cells. In this context, several experimental data have shown that caloric restriction and acute fasting are able to improve experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the mouse model of MS. Despite this evidence, no specific studies have been performed to understand, at cellular level, the mechanism of action of caloric restriction in the context of autoimmunity and MS in humans. The aim of this study is to understand the effect of mild caloric restriction on MS progression and activity. Furthermore, since it has been shown that the composition of the gut microbiota is strongly influenced by "pro-inflammatory" foods such as cow's milk and gluten and their removal is associated with the reduction of inflammation during autoimmune diseases, such as chronic inflammatory bowel disease (IBD) and juvenile autoimmune diabetes, the aim of our project is also to understand the effect of calorie restriction associated with the removal of specific foods, such as cow's milk and gluten, on disease progression.

### RESULTS

Since that the main objective of this study is to evaluate the effect of calorie restriction on the MS progression, at enrolment, the nutritionists performed a nutritional visit and a specific and personalized nutritional profile was developed in order to reduce the patient's caloric intake (calorie restriction of 15-20% compared to the average calories normally consumed) with or without the elimination of highly inflammatory foods (gluten and cow's milk). A group of MS patients was assigned to the control group who continue to follow the normal diet. After enrolment, it has been also performed a blood sampling from all MS patients included in the study to assess the composition and percentage of different immune system cell populations and the number and function of regulatory T cells, a cellular subpopulation involved in the mechanisms of immunological self tolerance. MS patients are periodically monitored by nutritionists by impedencemetry to verify adherence to the nutritional protocol and every 6 months a blood sampling is performed to evaluate the effects of caloric restriction on the immune-metabolic asset. To date, we have almost completed the enrolment of all patients as per the original study design which will end in June.

After enrollment of all patients, they will be followed up for 24 months. At the end of the follow-up period, both clinical (EDSS, relapses, number of lesions, etc.) and molecular and cellular data will be analyzed to evaluate the effect of different treatments on the course of the disease. This study is also part of the Multiact project for the active involvement of MS patients and of personnel involved in the study (nutritionists, neurologists, researchers, psychologists, etc.) in research related to the project.

## CONCLUSIONS

The aim of this study is to understand the effect of calo-

rie restriction on MS progression to improve the efficacy of first-line pharmacological treatments by calorie restriction with or without removal of specific "pro-inflammatory" foods (gluten/milk), by modulating the metabolic state of the host. The data obtained could contribute to the improvement of knowledge on the pathogenesis of the disease and on the reason of its growing prevalence in more developed countries. In addition, the comprehension of the effect of metabolic modulation on the pathogenesis and progression of MS could contribute to the development of new therapeutic protocols that associate nutritional approaches to first-line treatments.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Gilio L, Iezzi E, Galiifi G, Carbone F, Micillo T, Dolcetti E, Azzolini F, Bruno A, Borrelli A, Mandolesi G, Rovella V, Storto M, Finardi A, Furlan R, Centonze D, Matarese G. Osteopontin Is Associated with Multiple Sclerosis Relapses. *Biomedicines*. 2023 Jan 11;11(1):178
- Alhamar G, Briganti S, Maggi D, Viola V, Faraj M, Zannella C, Galdiero M, Franci G, Fusco C, Isgrò C, Leanza G, Malandrucchio I, Spinelli A, Tramontana F, Iaria D, Tortoriello R, Pieralice S, Rosati M, Matarese G, Pozzilli P, Galgani M, Strollo R. Pre-vaccination glucose time in range correlates with antibody response to SARS-CoV-2 vaccine in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023 Jan 6;dgad001
- de Candia P, Procaccini C, Russo C, Lepore MT, Matarese G. Regulatory T cells as metabolic sensors. *Immunity*. 2022 Nov 8;55(11):1981-1992
- Romano A, Zuchegna C, Zannini G, Messina S, Fusco C, Pezone A, Grillo R, de Candia P, Matarese G, Porcellini A. A rapid and inexpensive genotyping method using dried blood spots for mutational analysis in a mutant mouse model: an update. *Mol Biol Rep*. 2022 Sep;49(9):9071-9077
- Bruzzaniti S, Piemonte E, Mozzillo E, Bruzzese D, Lepore MT, Carbone F, de Candia P, Strollo R, Porcellini A, Marigliano M, Maffei C, Bifulco M, Ludvigsson J, Franzese A, Matarese G, Galgani M. High levels of blood circulating immune checkpoint molecules in children with new-onset type 1 diabetes are associated with the risk of developing an additional autoimmune disease. *Diabetologia*. 2022 Aug;65(8):1390-1397
- Azzolini F, Gilio L, Pavone L, Iezzi E, Dolcetti E, Bruno A, Buttari F, Musella A, Mandolesi G, Guadalupi L, Furlan R, Finardi A, Micillo T, Carbone F, Matarese G, Centonze D, Stampanoni Bassi M. Neuroinflammation Is Associated with GFAP and sTREM2 Levels in Multiple Sclerosis. *Biomolecules*. 2022 Jan 27;12(2):222
- de Candia P, Matarese G. The folate way to T cell fate. *Immunity*. 2022 Jan 11;55(1):1-3.
- Di Silvestre D, Garavelli S, Procaccini C, Prattichizzo F, Passignani G, De Rosa V, Mauri P, Matarese G, de Candia P. CD4 + T-Cell Activation Prompts Suppressive Function by Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Oct 27;9:753884
- Feizi N, Focaccetti C, Pacella I, Tucci G, Rossi A, Costanza M, Pedotti R, Sidney J, Sette A, La Rocca C, Procaccini C, Matarese G, Barnaba V, Piconese S. CD8+ T cells specific for cryptic apoptosis-associated epitopes exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis*. 2021 Oct 29;12(11):1026
- de Candia P, Matarese G. Reimagining an immunological dogma. *Nat Immunol*. 2021 Oct 18.
- Nardelli C, Granata I, Nunziato M, Setaro M, Carbone F, Zulli C, Piloni V, Capoluongo ED, De Palma GD, Corcione F, Matarese G, Salvatore F, Sacchetti L. 16S rRNA of Mucosal Colon Microbiome and CCL2 Circulating Levels Are Potential Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 4;22(19):10747
- Simula L, Antonucci Y, Scarpelli G, Cancila V, Colamatteo A, Manni S, De Angelis B, Quintarelli C, Procaccini C, Matarese G, Tripodo C, Campello S. PD-1-induced T cell exhaustion is controlled by a Drp1-dependent mechanism: Drp1-dependent mechanism. *Mol Oncol*. 2021 Sep 17
- De Vito F, Musella A, Fresegna D, Rizzo FR, Gentile A, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Buttari F, Procaccini C, Colamatteo A, Bullitta S, Guadalupi L, Caioli S, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Bruno A, Dolcetti E, Furlan R, Finardi A, Licursi V, Drulovic J, Pekmezovic T, Fusco C, Bruzzaniti S, Hornstein E, Uccelli A, Salvetti M, Matarese G, Centonze D, Mandolesi G. MiR-142-3p regulates synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2021 Sep 7



- Procaccini C, Garavelli S, Carbone F, Di Silvestre D, La Rocca C, Greco D, Colamatteo A, Lepore MT, Russo C, De Rosa G, Faicchia D, Prattichizzo F, Grossi S, Campomenosi P, Buttari F, Mauri P, Uccelli A, Salvetti M, Brescia Morra V, Vella D, Galgani M, Mottola M, Zuccarelli B, Lanzillo R, Maniscalco GT, Centonze D, de Candia P, Matarese G. Signals of pseudo-starvation unveil the amino acid transporter SLC7A11 as key determinant in the control of Treg cell proliferative potential. *Immunity*. 2021 May 11;51(5):1074-1084.e10
- Carbone F, Bruzzaniti S, Fusco C, Colamatteo A, Micillo T, De Candia P, Bonacina F, Norata GD, Matarese G. Metabolomics, Lipidomics, and Immunometabolism. *Methods Mol Biol*. 2021;2285:319-328
- de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Alviggi C, La Cava A, Matarese G. The pleiotropic roles of leptin in metabolism, immunity, and cancer. *J Exp Med*. 2021 May 3;218(5):e20191593
- Perna F, Bruzzaniti S, Piemonte E, Maddaloni V, Atripaldi L, Sale S, Sanduzzi A, Nicastro C, Pepe N, Bifulco M, Matarese G, Galgani M, Atripaldi L. Serum levels of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen associate with inflammatory status and disease severity in COVID-19 patients. *Clin Immunol*. 2021 Apr 2;108720
- Norata G, Matarese G. Novel acquisitions in cell immunometabolism. *Mol Aspects Med*. 2021 Feb 4;100945
- Palma C, La Rocca C, Gigantino V, Aquino G, Piccaro G, Di Silvestre D, Brambilla F, Rossi R, Bonacina F, Lepore MT, Audano M, Mitro N, Botti G, Bruzzaniti S, Fusco C, Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Alviggi C, Puca A, Grassi F, Rezzonico-Jost T, Norata GD, Mauri P, Netea MG, de Candia P, Matarese G. Caloric Restriction Promotes Immunometabolic Reprogramming Leading to Protection from Tuberculosis. *Cell Metab*. 2021 Jan 4;51(1):150-161.e10
- de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Matarese G. T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol*. 2021 Jan;42(1):18-30
- Prattichizzo F, De Nigris V, Sabbatinelli J, Giuliani A, Castaño C, Párrizas M, Crespo I, Grimaldi A, Baranzini N, Spiga R, Mancuso E, Rippo MR, Procopio AD, Novials A, Bonfigli AR, Garavelli S, La Sala L, Matarese G, de Candia P, Olivieri F, Ceriello A. CD31 Positive-Extracellular Vesicles from Patients with Type 2 Diabetes Shuttle a miRNA Signature Associated with Cardiovascular Complications. *Diabetes*. 2021 Jan;70(1):240-254
- Horwitz DA, Liu A, Bickerton S, Castaldo G, Matarese G, Fahmy TM, La Cava A. Anti-CD2 Antibody-Coated Nanoparticles Containing IL-2 Induce NK Cells That Protect Lupus Mice via a TGF- $\beta$ -Dependent Mechanism. *Front Immunol*. 2020 Dec 16;11:583338
- Galgani M, Bruzzaniti S, La Rocca C, Micillo T, de Candia P, Bifulco M, Matarese G. Immunometabolism of regulatory T cells in cancer. *Mol Aspects Med*. 2020 Nov 26;100936.
- Bruzzaniti S, Cirillo E, Prencipe R, Giardino G, Lepore MT, Garziano F, Perna F, Procaccini C, Masciolo L, Pagano C, Fattorusso V, Mozzillo E, Bifulco M, Matarese G, Franzese A, Pignata C, Galgani M. CD4+ T Cell Defects in a Mulibrey Patient With Specific TRIM37 Mutations. *Front Immunol*. 2020 Sep 18;11:1742
- Procaccini C, Matarese G. Where Mitochondria Meet Autoimmunity: The Treg Cell Link. *Cell Metab*. 2020 Oct 6;32(4):507-509
- Stampanoni Bassi M, Buttari F, Simonelli I, Gilio L, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Visconti A, Paolillo A, Storto M, Gambardella S, Ferese R, Salvetti M, Uccelli A, Matarese G, Centonze D, De Vito F. A Single Nucleotide ADA Genetic Variant Is Associated to Central Inflammation and Clinical Presentation in MS: Implications for Cladribine Treatment. *Genes (Basel)*. 2020 Sep 30;11(10):E1152
- Galgani M, Bruzzaniti S, Matarese G. Immunometabolism and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2020 Aug 8;67:10-17
- Li X, Colamatteo A, Kalafati L, Kajikawa T, Wang H, Lim JH, Bdeir K, Chung KJ, Yu X, Fusco C, Porcellini A, De Simone S, Matarese G, Chavakis T, De Rosa V, Hajishengallis G. The DEL-1- $\beta$ 3 integrin axis promotes regulatory T cell responses during inflammation resolution. *J Clin Invest*. 2020 Aug 20;137530
- Garavelli S, Bruzzaniti S, Tagliabue E, Di Silvestre D, Prattichizzo F, Mozzillo E, Fattorusso V, La Sala L, Ceriello A, Puca AA, Mauri P, Strollo R, Mariagliano M, Maffei C, Petrelli A, Bosi E, Franzese A, Galgani M, Matarese G, de Candia P. Plasma circulating miR-23~27~24 clusters correlate with the immunometabolic derangement and predict C-peptide loss in children with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2020 Jul 29
- Vuotto C, Battistini L, Caltagirone C, Borsellino G. Neuroscientist. Gut Microbiota and Disorders of the Central Nervous System. 2020 Oct- Dec;26(5-6):487-502. doi: 10.1177/1073858420918826. Epub 2020 May 22
- Guerrera G, Ruggieri S, Picozza M, Piras E, Gargano F, Placido R, Gasperini C, Salvetti M, Buscarinu MC, Battistini L, Borsellino G, Angelini DF. EBV-specific CD8 T lymphocytes and B cells during glatiramer acetate therapy in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Aug 17;7(6):e876



- Kunkl M, Amormino C, Frascolla S, Sambucci M, De Bardi M, Caristi S, Arcieri S, Battistini L, Tuosto L. CD28 Autonomous Signaling Orchestrates IL-22 Expression and IL-22-Regulated Epithelial Barrier Functions in Human T Lymphocytes. *Front Immunol.* 2020 Oct 14;11:590964
- Di Rita A, Angelini DF, Maiorino T, Caputo V, Cascella R, Kumar M, Tiberti M, Lambrughli M, Wesch N, Löhr F, Dötsch V, Carinci M, D'Acunzo P, Chiurchiù V, Papaleo E, Rogov VV, Giardina E, Battistini L, Strappazon F. Characterization of a natural variant of human NDP52 and its functional consequences on mitophagy. *Cell Death Differ.* 2021 Mar 15. doi: 10.1038/s41418-021-00766-3. Epub ahead of print. PMID: 33723372
- Capone A, Naro C, Bianco M, De Bardi M, Noël F, Macchi P, Battistini L, Soumelis V, Volpe E, Sette C. Systems analysis of human T helper17 cell differentiation uncovers distinct time-regulated transcriptional modules. *iScience.* 2021 Apr 30;24(5):102492. doi: 10.1016/j.isci.2021.102492

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2018 per l'ammontare di 254.582 €**  
FISM Research special project funded in 2018 for an amount of € 254,582

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



## Giovanni Ristori

CENTERS, Ospedale S. Andrea, Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

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

**Giovanni Ristori, Marco Salvetti**, CENTERS, Ospedale S. Andrea, Dipartimento NESMOS, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

**Maria Pia Amato**, Dipartimento NEUROFARBA, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

**Giuseppe Matarese**, (IEOS-CNR) c/o Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli IEOS - CNR, Napoli, Italia

**Nicola De Stefano**, Laboratorio di Neuroimmagini Quantitative, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

**Maria Pia Sormani**, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

Oltre a questi Istituti, sono stati individuati e coinvolti nel processo di reclutamento altri 23 Centri per la SM (inclusi nella tabella). La Fondazione Italiana SM (FISM), attraverso il Registro Italiano SM (in collaborazione con l'Università di Bari), è coinvolta nel processo di identificazione della RIS. *Besides the proposing institutions other 23 MS Centers (included in the table) were identified and involved in recruitment process. The Italian MS Foundation (FISM), through the Italian MS Register (founded in collaboration with the University of Bari), is involved in the process of RIS condition.*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nell'ultima decade si è assistito ad 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 per i pazienti. Approcci sicuri che possono essere utilizzati dall'inizio (biologico) della malattia, senza importanti rischi di effetti collaterali, non sono ancora alla nostra portata. Il vaccino contenente Bacille Calmette-Guérin (BCG) può avere queste caratteristiche poiché è risultato avere un effetto benefico in pazienti con SM precoce e primo episodio demielinizzante. Essendo sicuro, economico e di facile utilizzo, noi proponiamo il suo uso per prevenire la progressione del processo demielinizzante in soggetti con sindrome radiologicamente isolata (RIS: persone asintomatiche con quadro di risonanza magnetica del sistema nevoso centrale suggestiva di SM). Nell'ambito dell'attività del Centro per le Terapie Neurologiche Sperimentali (CENTERS - progetto speciale della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM) verrà condotto uno studio multicentrico, in doppio cieco, controllato con placebo. Cento persone con RIS saranno randomizzate in due gruppi: 50 riceveranno una singola dose of BCG and 50 una singola dose di placebo.

I due gruppi saranno sottoposto alle seguenti procedure alla baseline a differenti punti di tempo:

- Status clinico, scale MSFC, e "symbol digit modality test", ogni sei mesi durante i 3 anni di follow-up.
- Risonanza magnetica dell'encefalo con gadolinio ai mesi 6, 12, 24, 36.
- Profilo immuno-metabolico, come descritto dal gruppo di Matarese, ai mesi 6, 12, 24, 36.

L'end point primario dello studio sarà il numero di lesioni "attive" in risonanza durante il follow-up presso il Laboratorio di Neuroimmagini Quantitative dell'Università di Siena. L'end point secondario sarà il tempo di occorrenza del primo evento clinico durante i 3 anni di follow-up. Gli endpoint esplorativi basati sulla risonanza magnetica (lesioni corticali, variazioni del volume cerebrale e rapporti di trasferimento della magnetizzazione) saranno presi in considerazione anche per il follow-up di 3 anni. Un'analisi multiparametrica sarà applicata per monitorare le variazioni nel profilo immuno-metabolico dei partecipanti allo studio prima e dopo la vaccinazione con BCG. Saranno valutati la sicurezza e la fattibilità di questo approccio.

## RISULTATI

L'inizio del progetto è stato ritardato a causa dell'indi-

sponibilità del vaccino BCG solo in concomitanza con l'approvazione del progetto. Dopo la disponibilità iniziale del vaccino BCG dalle fonti storiche (ceppi Pasteur e danesi), è diventato chiaro che il vaccino non sarebbe stato accessibile per uso sperimentale.

Così abbiamo realizzato in collaborazione con lo studio CRO una ricerca nei paesi europei (per evitare lunghe e costose procedure per ottenere il vaccino fuori dall'Europa) ed è stata finalmente individuata un'azienda polacca. Mentre la procedura, peraltro lunga, per ottenere il ceppo polacco è stata implementata in collaborazione con il CRO e l'AIMS, è stato compiuto uno sforzo a livello nazionale per includere i centri per la SM disponibili dall'Italia per

reclutare persone RIS. Questo è stato un passo importante data la rarità della condizione oggetto di studio. Attualmente sono stati individuati 21 Centri in tutta Italia e il Registro Italiano SM è stato coinvolto nel processo di identificazione della condizione RIS.

Il dossier è stato presentato e accettato all'Osservatorio AIFA e al Comitato Etico del Centro che guida la sperimentazione che ha incluso altre 3 persone.

Il dossier è stato sottoposto agli altri Centri individuati, dopo la predisposizione di un protocollo di modifica. Attualmente sono state reclutate 11 persone con RIS in tre Centri coinvolti nel progetto.

## Bacille Calmette-Guérin vaccine in radiologically isolated syndrome

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) witnessed relevant therapeutic progress in the last decade. This notwithstanding, safety, quality of life and overtreatment remain elements of strong concern for the patients. Safe and manageable therapies that can be used since the (biological) onset of the disease, without risk of overtreatment, are important unmet needs in MS. Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine may have these characteristics since it resulted beneficial in early MS and first demyelinating episodes. Being safe, cheap and handy, we propose to investigate its use to prevent progression of the demyelinating process in radiologically isolated syndrome (RIS: asymptomatic persons with brain MRI highly suggestive of MS)

A multicentric, 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: 50 to receive a single dose of BCG and 50 a single dose of placebo. The two groups will undergo the following procedures at baseline and different time points:

- Clinical status, including multiple sclerosis functional composite scale and symbol digit modality test, every 6 months for the 3-year follow-up.
- MRI brain scan with gadolinium at months 6, 12, 24, 36.
- Immune-metabolic profiling, as recently described by Matarese's group at months 6, 12, 24, 36.

The primary endpoint of the study will be the number of active lesions at MRI developed over one year. The MRI data analysis will be carried out at the Quantitative Neuroimaging Lab of the University of Siena. The secondary endpoint will be the time to the first clinical event over the

3 years period. Exploratory MRI-based endpoints (cortical lesions, brain volume changes, and magnetization transfer ratios) will be also considered for the 3-year follow up. A multiple parameter analysis will be applied to monitor changes in the immune-metabolic profiling before and after BCG. Safety and feasibility of this approach will be assessed.

### RESULTS

The start of the project was delayed because of the unavailability of the BCG vaccine just concomitantly to the project approval. After initial availability from the historical sources (Pasteur and Danish strains) of BCG vaccine, it became clear that the vaccine would not be accessible for experimental use. So we implemented in collaboration with the study CRO a research in European countries (to avoid long and expensive procedures to obtain the vaccine outside Europe) and a Polish firm was at last identified. While the anyway long procedure to obtain the Polish strain was implemented in collaboration with the CRO and AISM, a nationwide effort was carried out to include available MS Centers from Italy to recruit RIS people. That was an important step given the rarity of the condition under study.

At present, twenty-one Centers were identified all over Italy, and the Italian MS Register has been involved in the identification process of RIS condition.

The dossier has been submitted and accepted to AIFA Osservatorio and the PI's Ethic Committee. The PI's Center has included 3 people.

The dossier is being submitted to the other Centers identified, after the preparation of a protocol's amendment. Currently 11 people with RIS have been recruited in three Centers involved in the project.

N°	Centro / Center	Città / City	Ricercatore Investigator	N° soggetti arruolati N° recruited subjects	Stato / Status
1	S. Andrea	Roma	Ristori Giovanni	5	RECRUITING
2	Policlinico di Bari	Bari	Trojano Maria		RECRUITING
3	AOU Careggi	Firenze	Annamaria Amato		RECRUITING
4	Ospedale San Camillo	Roma	Gasperini Claudio		RECRUITING
5	IRCCS NEUROMED	Pozzilli	Centonze Diego		RECRUITING
6	Policlinico Gemelli	Roma	Mirabella Massimiliano	1	RECRUITING
7	PO San Filippo Neri	Roma	Elisabetta Ferraro		RECRUITING
8	AOU Senese	Siena	De Stefano Nicola		ATTIVABILE
9	Università di Genova	Genova	Inglese Matilde		RECRUITING
10	PO Di Gallarate	Gallarate VA	Zaffaroni Mauro		RECRUITING
11	UO di Neurologia Fondazione Istituto G. Giglio	Cefalù PA	Grimaldi Luigi		RECRUITING
12	AOU policlinico Vittorio Emanuele	Catania	Patti Francesco		RECRUITING
13	Ospedale R Binaghi	Cagliari	Jessica Frau		RECRUITING
14	Fondazione Don Gnocchi	Milano Don Gnocchi	Rovaris Marco		RITIRATO
15	IRCCS Centro Neurolesi "Bonino Pulejo"	Messina	Bramanti Placido		RECRUITING
16	AOU Federico II	Napoli FEDERICO II	Lanzillo Roberta	5	RECRUITING
17	Ospedale Cardarelli	Napoli Cardarelli	Maniscalco Giorgia		RECRUITING
18	AOU Ospedali Riuniti	Foggia	Avolio Carlo		RECRUITING
19	Policlinico Tor Vergata	Roma PTV	Marfia Gerolama		RECRUITING
20	Istituto Besta	Milano Besta	Confalonieri Paolo		RECRUITING
21	Ospedale Civile Maggiore	Verona	Calabrese Massimiliano		In fase di valutazione
22	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna	Bologna	Alessandra Lugaresi		Attivazione prevista in data 01/02/2023
23	Azienda Ospedaliera Universitaria Luigi Vanvitelli di Napoli	Napoli	Antonio Gallo		In sottomissione



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Ristori G, Faustman D, Matarese G, Romano S, Salvetti M. *Bridging the gap between vaccination with Bacille Calmette-Guérin (BCG) and immunological tolerance: the cases of type 1 diabetes and multiple sclerosis.* *Curr Opin Immunol.* 2018 Dec;55:89-96
- Amato MP, De Stefano N, Inglese M, Morena E, Ristori G, Salvetti M, Trojano M. *Secondary Prevention in Radiologically Isolated Syndromes and Prodromal Stages of Multiple Sclerosis.* *M. Front Neurol.* 2022 Mar 14;13:787160

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2017 e l'ammontare di 279.959 €**  
FISM Research special project funded in 2017 and the amount of € 279,959

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



## Monica Ulivelli

*Dipartimento Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Daiana Bezzini**, *Dipartimento Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena, Siena Italia*

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

**Alessia Di Sapio**, *SCDO neurologia, AOUS San Luigi, Orbassano (TO), Italia*

**Marco Salvetti**, *Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

**Francesco Patti**, *Università degli Studi di Catania, Catania, Italia*

**Alice Laroni**, *Università degli Studi di Genova, Genova Italia*

**Claudio Gasperini**, *Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma, Italia*

**Viviana Nociti**, *Fondazione Policlinico Universitario 'A. Gemelli' Roma, Italia*

**Maria Pia Amato**, *Università di Firenze, Firenze, Italia*

**Diego Centonze**, *IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) NEUROMED Pozzilli (IS), Italia*

**Luca Massacesi**, *Divisione Neurologia II, Ospedale Universitario Careggi, Università di Firenze, Firenze, Italia*

**Alessandra Lugaresi**, *UOSI Riabilitazione Sclerosi Multipla - Ospedale Bellaria- Bologna, Italia*

**Roberta Lanzillo**, *Università Federico II Napoli, Napoli, Italia*

**Benedetta Calchetti**, *Ospedale San Donato, Arezzo, Italia*

**Maria Letizia Bartolozzi**, *Struttura ospedaliera complessa neurologia Ospedale San Giuseppe, Empoli, Italia*

**Mario Falcini**, *Ospedale Misericordia e Dolce, Prato, Italia*

**Katrin Plewnia**, *Ospedale della Misericordia, Grosseto, Italia*

**Gino Volpi**, *Ospedale San Jacopo di Pistoia, Pistoia, Italia*

**Nicola De Stefano**, *Dipartimento Di Scienze Mediche, Chirurgiche e di Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, c/o Policlinico Le Scotte, Siena, Italia*

**Cristina Frittelli**, *Ospedale Felice Lotti, Pontedera, PI, Italia*

**Fioravante Capone**, *Università Campus Bio-Medico, Roma, Italia*

**Maura Pugliatti**, *Unità di Neurologia Clinica Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico-Specialistiche Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia*

**Livia Pasquali**, *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia*

**Roberto Zarbo**, *Medicina, Chirurgia e Farmacia, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italia*

**Eleonora Cocco**, *Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia*

**Stefano De Biase**, *Aulss3- Ospedale dell'Angelo, Mestre, Italia*

**Sara Montepietra**, *Azienda USL - IRCCS, Reggio Emilia, Italia*

**Antonella Conte**, *Dipartimento Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

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

**Maria Luisa Piras**, *Presidio Ospedaliero San Francesco, Nuoro, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le persone con SM possono avere una maggiore suscettibilità alle infezioni, rispetto alla popolazione generale, correlata al grado di disabilità o all'uso di farmaci ad attività immunosoppressiva. L'uso di questi farmaci richiede una certa attenzione sulla possibilità di eventi infettivi. Inoltre, alcuni agenti infettivi possono scatenare ricadute della malattia. Per questo motivo, la conoscenza dello stato di suscettibilità alle infezioni dei pazienti è necessaria ai fini di una corretta scelta terapeutica ma anche per stimolare i decisori politici in campo sanitario a valutare la necessità o meno di una campagna di vaccinazioni diretta alle persone con SM. Risulta inoltre essenziale per stabilire una corretta programmazione delle vaccinazioni, che andrebbero effettuate prima di una terapia immunosoppressiva. Nonostante queste considerazioni, non ci sono dati disponibili sulla prevalenza dei pazienti suscettibili alle infezioni, considerando sia le persone non vaccinate sia quelle mai esposte all'infezione naturale. La sicurezza di molti vaccini nelle persone con SM è stata solo in parte investigata e i dati sulla loro correlazione con un aumentato rischio di ricadute sono discordanti e non disponibili per tutte le vaccinazioni. In aggiunta, i pochi studi che suggeriscono una possibile correlazione sono stati spesso condotti su campioni di piccole dimensioni o su sottogruppi con caratteristiche specifiche. La carenza di dati informativi riguardanti la sicurezza dei vaccini nella popolazione di persone con SM preclude la possibilità di offrire nette raccomandazioni sul loro utilizzo in questi pazienti, nonostante l'importanza nella pratica clinica.

Gli scopi di questo studio sono: 1) valutare lo stato di immunizzazione, indotto dalla malattia naturale o dalla vaccinazione, contro i principali agenti infettivi prevenibili dai vaccini disponibili; 2) valutare la sicurezza della maggior parte dei vaccini utilizzati nella pratica clinica tramite la registrazione delle ricadute o della progressione della malattia come evento avverso del vaccino nel periodo di rischio definito, e confrontando il tasso di ricadute annuo prima e dopo vaccinazione.

Lo studio, con durata prevista iniziale di 3 anni, e prorogato per il rallentamento dovuto alla pandemia, è concepito come multicentrico, osservazionale, retrospettivo e prospettico. È previsto l'arruolamento di una coorte di 3.000 persone con SM attraverso l'utilizzo di database di 28 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 2023. I dati sull'immunizzazione naturale, e cioè il titolo degli anticorpi sierici specifici, saranno raccolti dalle cartelle cliniche dei centri, mentre i dati sui vaccini effettuati saranno recuperati dal libretto vaccinale.

Per studiare l'impatto dei vaccini sul rischio di ricaduta, saranno analizzati i dati sui pazienti vaccinati durante la malattia. Sarà monitorato un periodo da 2 fino a 6 mesi dopo il vaccino: il periodo di 2 mesi è considerato come periodo di massimo rischio clinico, mentre quello di 6 è l'estensione massima del periodo di rischio. Inoltre, in caso di recidiva, sarà quantificata la disabilità con la scala EDSS, confermata a 6 mesi dal vaccino. Questi dati potrebbero far luce sulla relazione tra vaccinazione e SM, aggiungendo nuove informazioni sulla loro sicurezza.

Il comitato scientifico del Registro Italiano SM ha approvato la richiesta di estrazione di dati riguardanti le caratteristiche anagrafiche e di malattia dei pazienti arruolati nello studio e già inseriti nel Registro.

## RISULTATI

Lo studio ha subito un rallentamento a causa della difficoltà di arruolare pazienti durante la situazione pandemica. Inoltre, in alcune Regioni, si è riscontrata una difficoltà nell'acquisizione dei libretti vaccinali, talvolta registrati nella sola versione cartacea che rende il reperimento non immediato e spesso impossibile. Alcuni Centri clinici SM inclusi ab initio nello studio hanno cominciato ad arruolare in ritardo per motivi logistici e di tipo amministrativo. Preso atto di queste difficoltà, sono stati arruolati ulteriori 7 Centri clinici SM che arricchiscono lo studio anche dal punto di vista della distribuzione territoriale.

Ad oggi, sono state comunque completate le schede di raccolta dati di circa 800 persone con SM.

È in corso un controllo di qualità dei database finora pervenuti. Il campione provvisorio è composto da 794 soggetti, età media 41,6 ( $\pm 11,13$  DS), di cui 342 vaccinati dopo la diagnosi di SM. La maggior parte dei soggetti sono di sesso femminile (562).

## CONCLUSIONI

Dall'esperienza di questo studio risulta chiara la difficoltà nel reperire i dati a riguardo dello stato vaccinale, ma lo sforzo si rende necessario vista l'importanza della conoscenza dello stato di immunizzazione e della prevenzione in questo ambito, sia nella gestione della malattia stessa che delle terapie modificanti il decorso.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) patients maybe more susceptible to infections, than the general population, in relation to increasing disability or some specific therapies. The use of immunosuppressant or immunomodulatory drugs requires particular attention with respect to the possibility of occurrence of infectious events. Moreover, some infectious agents may trigger exacerbations of the disease. So, the knowledge of overall susceptibility to infections in patients is necessary for therapeutic decision-making and to help policy makers to assess the need of a vaccine campaign targeted to MS patients. In addition, it is essential to establish a correct timetable of vaccination in MS patients, especially before starting therapies with immunosuppressant drugs.

Despite these considerations, there are no available data about the prevalence of MS patients susceptible to infections, considering those unvaccinated or never exposed to natural infections.

The safety of most of vaccines in MS patients has been partly investigated, and data on correlation between vaccination and increasing risk of relapses are still discordant or not available for some vaccines. In addition, the few studies that suggest a possible correlation are mostly carried out on small samples or on subgroups of patients with particular features. The deficiency of data regarding the vaccine safety in MS population precludes the possibility to offer clear-cut recommendations, despite the relevance of vaccinations in the clinical practice.

The aim of the current project on MS patients is twofold: 1) to assess immunisation status, due to past exposure to natural infectious diseases or vaccines, against major infectious agents preventable by available vaccines; 2) to assess the safety of most utilized vaccines in the clinical practice by recording relapses or disease progression as adverse event in the considered risk period after vaccination and using the annual relapse rate and its trend during the study period.

The project, with an initial planned duration of 3 years, and extended due to the slowdown caused by the pandemic, is conceived as a multicenter, observational, both retro- and prospective study. A cohort of about 3,000 people with MS will be enrolled among databases of 28 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 2023 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 course will be analysed. The study follow-up period will range between 2-6 months after vaccination: the 2-month period is considered as the maximum clinical risk, whereas the 6 month-period as the maximal extension of risk in time. In addition, in the case of a clinical relapse, the variation of disability will be evaluated with EDSS scale confirmed at 6 months. These data might shed light on the relationship between vaccination and MS, adding new insights on their safety.

The Scientific Committee of the Italian MS Registry approved the request for extraction of data regarding the personal and disease characteristics of patients enrolled in the study and already included in the Registry.

## RESULTS

The study has slowed down due to the difficulty of enrolling patients during the pandemic situation. In addition, in some regions, there was difficulty in acquiring vaccination schedule, sometimes recorded in paper version only, making their retrieval not immediate and often impossible. Some MS Clinical Centers included ab initio in the study began enrolling late for logistical and administrative reasons. Taking note of these difficulties, additional 7 MS Clinical Centers were enrolled, which also enriches the study in terms of territorial distribution.

To date, however, data collection forms of about 800 people with MS have been completed.

A quality check of the databases received so far is ongoing. The provisional sample consists of 794 subjects, mean age 41.6 years ( $\pm 11.13$  SD), of whom 342 were vaccinated after diagnosis of MS. Most of the subjects are females (562).

## CONCLUSIONS

It is clear from the experience of this study that it is difficult to find data regarding vaccinations in MS, but the effort is necessary given the relevance of knowledge of immunization status and prevention in this area, both for the management of the disease itself and of disease-modifying therapies.



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

- *Bezzini D, Battaglia MA, Olivelli M. Immunisation status against major diseases preventable with vaccines in multiple sclerosis patients. 16th World Congress on Public Health, Rome, 12-17 October 2020*

**Progetto speciale di ricerca FISM finanziato nel 2019 e l'ammontare di 80.570,5 €**  
FISM Research special project funded in 2019 and the amount of € 80,570.5



**DATA SHARING**  
DATA SHARING

---

---

# **Network Italiano di neuroimaging (INNI)**

The Italian Neuroimaging  
Network Initiative (INNI)

---

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

La risonanza magnetica è un importante strumento paraclinico per diagnosticare e monitorare la sclerosi multipla (SM). La definizione di metodi standardizzati per la raccolta e l'analisi di tecniche MRI avanzate è fondamentale non solo per migliorare la comprensione della fisiopatologia e dell'evoluzione della malattia, ma anche per generare ipotesi di ricerca, monitorare il trattamento, aumentare il rapporto costo-efficacia e la potenza delle sperimentazioni cliniche.

L'iniziativa INNI, che coinvolge centri e ricercatori con competenze riconosciute a livello internazionale, ha l'obiettivo principale di determinare e convalidare nuovi biomarcatori di risonanza magnetica (RM) da utilizzare come predittori e/o risultati in futuri studi sulla SM. Inoltre, INNI mira anche a guidare l'applicazione della risonanza magnetica per la SM a livello nazionale. La definizione di standard di RM e protocolli clinici per la valutazione dei pazienti con SM in Italia, consentirà di integrare i dati ottenuti da diversi centri, per testare specifiche ipotesi di ricerca sulla fisiopatologia della malattia e sugli effetti del trattamento che potrebbero infine promuovere la medicina personalizzata.

Il network INNI è guidato da un Comitato Scientifico i cui membri sono il Principal Investigator dello studio (Massimo Filippi di Milano), i leader degli altri centri coinvolti nell'iniziativa (Patrizia Pantano di Roma, Nicola De Stefano di Siena, Gioacchino Tedeschi di Napoli e Maria Rocca di Milano) e rappresentanti della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), proprietaria del database. Il database INNI online è disponibile all'indirizzo: <https://database.inni-ms.org>.

Il contenuto del database è disponibile solo per gli utenti autorizzati, che hanno ricevuto login e password appropriati.

Attualmente, sono presenti nel database i dati di 2.535 soggetti, con l'aumento di 1742 scansioni RM durante l'ultimo anno (attualmente, 4762 esami MRI, rispetto a 3020 esami all'inizio del progetto). Il centro di coordinamento ha continuato a svolgere una revisione dettagliata dei dati RMI dei soggetti attualmente disponibili nel repository INNI, per verificarne la qualità e la conformità al protocollo, secondo le modalità descritte in dettaglio in una pubblicazione dedicata.

Durante la prima fase del progetto è stato realizzato un sistema web-based (<https://database.inni-ms.org>) in collaborazione con il consorzio GARR, il network Italiano per la ricerca e la formazione ([www.garr.it](http://www.garr.it)). Consente la raccolta online di dati clinici, neuropsicologici e di risonanza magnetica dai centri partecipanti.

Durante il primo triennio, INNI ha agito su tre diverse linee strategiche di azione:

1. Manutenzione e espansione continua dell'infrastruttura
2. Sviluppo di progetti di ricerca ad hoc basati sul contenuto di dati di INNI, finalizzati a convalidare a livello multicentrico le tecniche di risonanza magnetica
3. Promozione di un piano per la standardizzazione dell'uso della risonanza magnetica a livello nazionale, proponendo protocolli di acquisizione standardizzati da applicare per lo studio della malattia e aiutando i centri in tutta Italia alla messa a punto di questo protocollo, al fine di rendere omogeneo l'approccio per le persone con SM a livello nazionale.

In questo Compendio riportiamo la sintesi dei principali risultati dei progetti di ricerca INNI (Linea strategica 2).

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

Magnetic resonance imaging (MRI) is an important paraclinical tool to diagnose and monitor multiple sclerosis (MS). The definition of standardized methods for the collection and analysis of advanced MRI techniques is central not only to improve the understanding of disease pathophysiology and evolution, but also to generate research hypotheses, monitor treatment, increase cost-effectiveness and power of clinical trials.

**The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI)**, which involves centres and investigators with an International recognized expertise, has the major goal to determine and validate novel magnetic resonance imaging (MRI) biomarkers to be utilized as predictors and/or outcomes in future MS studies. In addition, INNI aims also to guide the application of MRI in MS at a national level. The definition of MRI standards and clinical protocols for the evaluation of MS patients in Italy will allow to integrate the data obtained from different centers to test specific hypotheses of research on the pathophysiology of the disease and on the effects of the treatment which might ultimately promote personalized medicine.

The INNI network is led by a Scientific Committee whose members are the principal investigator of the initiative (Massimo Filippi from Milan), the leaders of the other four MS centres involved in the initiative (Patrizia Pantano from Rome, Nicola De Stefano from Siena, Gioacchino Tedeschi from Naples, and Maria Rocca of Milan) and representatives of the Italian Multiple Sclerosis Foundation (FISM), owner of the database, but will be open to additional members.

The online INNI database is available at: <https://database.inni-ms.org>. The database content is available for authorized users only, who received appropriate login and password.

Currently, 2535 subjects, and of additional 1742 MRI exams during the last year (currently, 4762 MRI exams, compared to 3020 exams at grant start). A systematic verification of data upload was performed by weekly shipment of queries by e-mail. The coordinating center continued to perform a detailed revision of the MRI data of subjects currently available in the INNI repository, to verify their quality and protocol compliance, according to the procedures described in details in a dedicated publication.

During the first phase of the project, a web-based system was created (<https://database.inni-ms.org>) in collaboration with the GARR consortium, the Italian network for research and education ([www.garr.it](http://www.garr.it)). It allows the online collection of clinical, neuropsychological and MRI data from the participating centres.

During this three-year period, INNI acts on three different aspects:

1. Maintenance and continuous expansion of the infrastructure, including upload of new data, verification and pre-processing of data uploaded in the database, and implementation of new platform features (Action 1);
2. Development of ad-hoc research projects based on INNI content, aimed at a multicenter validation of MRI techniques (Action 2);
3. Promotion of a plan for the standardization of the use of MRI at a national level, by proposing standardized acquisition protocols to be applied for the study of MS patients and helping peripheral centers in the set-up of this protocol, in order to homogenize the approach to MS patients at a national level (Action 3).

Funds awarded:

In this Compendium we reported the summary of the main findings of the INNI research projects (Action 2).



#### LISTA DEI CENTRI PARTECIPANTI COINVOLTI NEL PROGETTO/ LIST OF THE PARTICIPANTS CENTER INVOLVED IN THE PROJECT

**Massimo Filippi**, *Neuroimaging Research Unit, Istituto Scientifico San Raffaele, Università "Vita-Salute" San Raffaele, Milano*

**Patrizia Pantano**, *Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma*  
**Nicola De Stefano**, *Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche, Neurologiche, Metaboliche e dell'Invecchiamento, Dipartimento Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Siena*

**Gioacchino Tedeschi**, *Centro di Alti Studi di Risonanza Magnetica SUN-FISM, Università degli studi della Campania 'Luigi Vanvitelli', Napoli*



**Fondi assegnati: 865.790 euro per il triennio (642.640 per le infrastrutture; 223.150 per progetti specifici) e 300.000 euro per il 4° anno di estensione**

Funds awarded: 865.790 euros for three years (642.640 for infrastructure; 223.150 for specific projects) and 300.000 euros for the 4th-year extension

# Misurare l'atrofia cerebrale: dalla ricerca alla pratica clinica



## Massimo Filippi

Unità di Neuroimaging Quantitativo; Divisione di Neuroscienze; Unità di Neurologia, IRCCS Ospedale San Raffaele; Università Vita-Salute San Raffaele; Unità di Neuroriabilitazione, IRCCS Ospedale San Raffaele; Servizio di Neurofisiologia, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Maria A. Rocca, Elisabetta Pagani, Loredana Storelli, Paola Valsasina, Paolo Preziosa, Mauro Sibilìa, Olga Marchesi**

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

**Gioachino Tedeschi**, Centro SM e Unità di Ricerca 3T-MRI, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate (DAMSS), Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Patrizia Pantano**, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia, IRCCS NEUROMED, Pozzilli, Italia

**Nicola De Stefano**, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nella sclerosi multipla (SM), uno dei più importanti obiettivi delle strategie terapeutiche correnti è bloccare la neurodegenerazione e promuovere la neuroprotezione. Attraverso l'uso dell'imaging di risonanza magnetica (RM) è stato dimostrato come l'atrofia della sostanza grigia (SG) sia più rilevante rispetto all'atrofia globale dell'encefalo o della sostanza bianca (SB) nello spiegare la disabilità clinica e la compromissione cognitiva in questa malattia. Anche il talamo è una struttura di particolare interesse nella SM. Gli obiettivi del progetto sono:

1. Confrontare diversi metodi allo stato dell'arte per la misurazione dell'atrofia cerebrale globale e della SG;
2. Studiare l'atrofia regionale dell'encefalo nei pazienti con SM e definirne la sua progressione;
3. Confrontare diversi metodi automatici per la segmentazione del talamo nei pazienti con SM al fine di ottenere un approccio affidabile.

## RISULTATI

Per questo studio abbiamo raccolto dalla piattaforma dell'iniziativa del network italiano di neuroimmagini (INNI) i dati clinici e di RM di 466 pazienti affetti da SM con forma recidivante-remittente (RR) e 279 controlli sani, dei quali 170 pazienti affetti da SM e 48 controlli avevano una rivalutazione ad un anno.

Per l'obiettivo 1, abbiamo confrontato tre metodi allo stato dell'arte: SIENA-X/XL v5.0.9, SPM-v12, e Jim-v8. Questi software sono stati applicati su tutti i soggetti dello studio al fine di stimare la concordanza (intra-class correlation coefficient [ICC]) dei risultati di volume cerebrale (globale e SG) e di atrofia longitudinale, l'effect size secondo il coefficiente d di Cohen al basale e la numerosità del campione richiesta per stimare un cambiamento significativo di atrofia a differenti livelli di potenza statistica (il più basso a 0.7,  $\alpha=0.05$ ). SPM-v12 e Jim-v8 hanno mostrato valori significativamente concordi sia per i volumi globali (ICC=0.93 per controlli e ICC=0.84 per i pazienti affetti da SM) e della SG (ICC=0.66 per controlli e ICC=0.90 per i pazienti affetti da SM) al basale sia per i valori di atrofia della SG longitudinali (ICC=0.35 per controlli e ICC=0.59 per i pazienti affetti da SM). Nessuna concordanza significativa è emersa invece nel confronto (sia cross-sectional che longitudinale) tra i risultati del software SIENA-X/XL con quelli di SPM-v12 e Jim-v8. SPM-v12 e Jim-v8 hanno mostrato l'effect size più alto per la stima dei volumi della SG al basale (0.63 e 0.61), mentre Jim-v8 e SIENA(XL) hanno mostrato la necessità di un campione più basso per stimare significativamente l'atrofia longitudinale dell'encefalo (58) e della SG (152), con una potenza statistica pari a 0.7. Per il secondo obiettivo, le metodiche di voxel-based morphometry e tensor-based morphometry

sono state applicate nei pazienti affetti da SM e controlli sani per determinare la distribuzione regionale di atrofia della SG e la sua progressione nel tempo. L'effetto del diverso centro è stato valutato con i seguenti metodi: nessuna correzione, un fattore nel modello statistico, metodo ComBat, procedure di campionamento per appaiare le distribuzioni del singolo centro. Nei pazienti affetti da SM, l'atrofia della SG è stata poi associata alla disabilità clinica, durata della malattia e volume delle lesioni in T2. Il metodo di armonizzazione più efficace è risultato essere quello ottenuto attraverso il sotto campionamento dei dati dei singoli centri. Il confronto tra pazienti affetti da SM e controlli al basale, ha mostrato, come atteso, una significativa atrofia del talamo, della SG profonda, del cervelletto e corticale. In particolare, l'atrofia dei nuclei sottocorticali correlava con il carico lesionale in T2. Dividendo i pazienti affetti da SM in base alla durata di malattia abbiamo trovato: per i pazienti con durata di malattia minore di 5 anni o tra i 6 e i 15 anni, una significativa atrofia della SG profonda, dell'amigdala e della regione temporale; per i pazienti con durata di malattia maggiore di 15 anni, una significativa atrofia del cervelletto. L'atrofia cerebellare, talamica e parietale correlava con la disabilità clinica. Al follow-up, i pazienti affetti da SM rispetto ai controlli hanno mostrato un significativo aumento di atrofia nel corpo calloso, nel giro precentrale, nella SB posteriore, regione temporale e peduncoli cerebellari. Il peggioramento della disabilità clinica al follow-up è risultato significativamente correlato alla progressione dell'atrofia in diverse regioni. Per l'obiettivo 3, abbiamo selezionato dal precedente campione una sotto popolazione di 141 pazienti con SMRR e

69 controlli che avessero una sequenza pesata in T1 ad alta risoluzione e una sequenza pesata in diffusione. Per 136 pazienti e 31 controlli sono stati raccolti anche i dati ad un anno di follow-up. I toolbox valutati per la segmentazione automatica del talamo sono: FSL-MIST (v-5.0.9), FSL-FIRST (v-5.0.9) e Freesurfer (v-6.0). FSL-FIRST e FSL-MIST hanno mostrato la più alta concordanza nei risultati di volume talamico, con un effect size maggiore per FSL-MIST nel differenziare pazienti affetti da SM e controlli. Le correlazioni al basale tra i volumi talamici e i dati demografici e clinici sono simili e modeste per i diversi metodi. Al follow-up, FSL-MIST ha mostrato la più bassa variabilità per i risultati longitudinali di atrofia talamica e una miglior capacità di discriminare pazienti con SM e controlli, rispetto agli altri metodi confrontati.

## CONCLUSIONI

La definizione di metodi standardizzati per l'analisi con tecniche di RM è centrale per migliorare la comprensione della patofisiologia e l'evoluzione della SM ma anche monitorare i trattamenti, migliorare il bilancio costo-beneficio e gli studi futuri. Usando il dataset multicentrico di INNI, abbiamo confrontato le performance dei diversi tools per la stima dell'atrofia cerebrale globale, della SG e talamica aumentando la solidità dei risultati. I risultati ottenuti tramite questo studio supportano quindi nella scelta del metodo automatico più adatto per la stima dell'atrofia nei pazienti con SM. Includendo metodi di armonizzazione nell'analisi di atrofia regionale, i risultati multicentrici hanno mostrato una maggiore stabilità, evidenziando l'importanza dell'uso di dataset multicentrici.

# Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice

## INTRODUCTION AND AIMS

Halting neurodegeneration and promoting neuroprotection in multiple sclerosis (MS) is one of the most important goals of current therapeutic strategies. Using magnetic resonance imaging (MRI), it has been demonstrated that gray matter (GM) atrophy is more relevant than whole-brain or white matter atrophy in explaining clinical disability and cognitive impairment in MS. The thalamus is also a structure of particular interest in this condition.

Aims of the project were:

1. to compare a set of available state-of-art methods for whole-brain and GM atrophy measurements;
2. to study morphometric abnormalities voxel-wise in MS patients and to define the longitudinal trajectories of their progression;
3. to obtain a reliable, automatic segmentation of the thalamus and to compare the results with existing automatic approaches.

## RESULTS

For the purpose of this project, 466 relapsing-remitting (RR) MS patients and 279 healthy controls (HC) were collected from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) repository, of which 170 MS patients and 48 HC had a 1-year follow-up re-evaluation.

For Aim 1, we compared three state-of-art available methods for whole-brain and GM atrophy measurements: Structural Image Evaluation using Normalization of Atrophy (SIENA-X/XL; version 5.0.9), Statistical Parametric Mapping (SPM-v12), and Jim-v8 (Xinapse Systems, Colchester, UK). These were applied to all subjects to assess the intra-class correlation coefficient (ICC) for cross-sectional whole-brain and GM tissue volumes and their longitudinal changes, the effect size according to the Cohen's d at baseline and the sample size requirement for whole-brain and GM atrophy progression at different power levels (lowest=0.7, 0.05 alpha level). We found

significant agreement between SPM-v12 and Jim-v8 for cross-sectional whole-brain (ICC=0.93 for HC and ICC=0.84 for MS) and GM volumes (ICC=0.66 for HC and ICC=0.90) and longitudinal assessment of GM atrophy (ICC=0.35 for HC and ICC=0.59 for MS), while no significant agreement was found in the comparisons between whole-brain and GM volumes for SIENA-X/XL and both SPM-v12 and Jim-v8. SPM-v12 and Jim-v8 showed the highest effect size for cross-sectional GM atrophy (Cohen's  $d=0.63$  and  $0.61$ ). Jim-v8 and SIENA(XL) showed the smallest sample size requirements for whole-brain (58) and GM atrophy (152), at 0.7 power level.

For Aim2, voxel-based morphometry and tensor-based morphometry were performed to determine the distribution of regional GM atrophy and its trajectories of progression. The center effect was accounted for with different methods: no correction, factor in the statistical model, ComBat method, sub-sampling procedure to match single-center distributions. By applying the best correction method, GM atrophy was assessed in MS patients vs HC and according to clinical disability, disease duration and T2 lesion volume. We found that the harmonization with the sub-sampling procedure was the more effective of the two strategies.

At baseline, the comparison between MS and HC identified thalamic (the most consistent result) and deep GM atrophy, as well as cerebellar and cortical atrophy. Deep GM nuclei atrophy correlated with T2 lesion volume. Other correlations were found in precentral and paracentral regions. MS patients with disease duration less than 5 years as well as between 6 and 15 years showed deep GM, amygdala and temporal lobe atrophy. At disease duration longer than 15 years, atrophy involved the cerebellum. Cerebellar, thalamic and parietal atrophy correlated with Expanded disability status scale (EDSS) score. At follow-up, compared to HC, MS patients showed atrophy of the corpus callosum and precentral gyrus, as well as extensive posterior white matter, temporal and cerebellar peduncle atrophy. Increase of EDSS was significant correlated with atrophy progression in several regions.

For Aim 3, a subset of 141 RRMS and 69 HC from the dataset used for Aims 1 and 2, with a baseline 3D T1-weighted and a diffusion weighted MRI was collected. For 136 MS and 31 HC we also collected the one-year follow-up acquisitions. 3DT1-weighted images and fractional anisotropy maps were used as input for thalamic segmentation using the FSL-MIST toolbox. The use of the following other approaches was evaluated: FSL-FIRST (v-5.0.9) and Freesurfer (v-6.0). At baseline, all software showed a good agreement in the results of thalamic volume, with the highest between FSL-FIRST and FSL MIST. All pipelines were able to significantly differentiate MS patients from HC, with the highest effect size for FSL-MIST. At baseline, Pearson's correlation among the results of the different pipelines and subjects' age was significant, but similar among the pipelines. On average, baseline correlations with clinical scores were low. At follow-up, FSL-MIST showed the lowest variability in comparison to the other pipelines and a better capability to differentiate MS patients from HC.

## CONCLUSIONS

The definition of standardized methods for the analyses of advanced MRI techniques is central not only to improve the understanding of disease pathophysiology and evolution, but also to generate research hypotheses, monitor treatment, increase cost-effectiveness and power of clinical trials.

Using the multicenter INNI dataset, we compared the performance of different tools for whole-brain, GM and thalamic atrophy on large-scale data increasing generalizability and robustness of the results. The free licence, the speed and the facility of integration in the clinical routine are important aspects to consider for the selection of the atrophy pipeline to use, and the findings obtained in this study should help in this choice for future MS studies. Moreover, harmonization based on sub-sampling more effectively decreased the residuals of the statistical model applied. Thus, the multicenter results were more robust, highlighting the importance of data repositories from multiple centers.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Rocca MA, Filippi M, for the INNI Network. Accepted, JMRI
- Storelli L, Rocca MA, Pantano P, Pagani E, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M, for the INNI Network. MRI quality control for the Italian Neuroimaging Network Initiative: moving towards big data in multiple sclerosis. *J Neurol* 2019; 266:2848-2858; doi: 10.1007/s00415-019-09509-4
- Pagani E, Storelli L, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Rocca MA, Filippi M, for the INNI Network. Multicenter data harmonization for regional brain atrophy and application to in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2023 Jan;270(1):446-459. doi: 10.1007/s00415-022-11387-2
- 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 (AAN 2019)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M, Rocca MA. Integration and Characterization of Brain MRI Data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the Study of Multiple Sclerosis. *OSR Scientific Retreat, Baveno, 14-16 marzo 2019, poster 276, page 114*
- 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
- Storelli L, Rocca MA, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M. Integration and characterization of brain MRI data from the Italian neuroimaging network initiative (INNI) for the study of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2019; 25 (S2): 480 (ECTRIMS 2019)
- Storelli L, Rocca MA, Pagani E, Pantano P, De Stefano N, Tedeschi G, Zaratini P, Filippi M. Integration and characterization of brain MRI data from the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) for the study of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2019; 40 (Suppl October 2019): S286-S287 (SIN 2019)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: application to the multicenter INNI dataset. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 418 (EAN 2021)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: Application to the multicenter INNI dataset. *J Neurol Sci* 2021; 429: 96 (118291) [doi:10.1016/j.jns.2021.118291] (WCN/SIN 2021)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Atrophy quantification in multiple sclerosis: application to the multicenter INNI dataset. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 398 (ECTRIMS 2021)
- Pagani E, Storelli L, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Zaratini P, Rocca MA, Filippi M. Regional analysis of atrophy in multiple sclerosis in a large multicenter dataset. *Mult Scler J* 2021; 27 (2S): 435-436 (ECTRIMS 2021)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Tedeschi G, De Stefano N, Rocca MA, Filippi M, INNI network. Quantification of thalamic volume in multiple sclerosis: from the multicenter INNI dataset towards the clinical application. *Mult Scler J* 2022; 28 (3S): 265-266 (P202) (ECTRIMS 2022)
- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Tedeschi G, De Stefano N, Rocca MA, Filippi M. Quantification of thalamic volume in multiple sclerosis: from the multicenter INNI dataset towards the clinical application. *Neurol Sci* 2022; 43 (Suppl 1): S365 (SIN 2022)

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



## Patrizia Pantano

*Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Silvia Tommasin, Costanza Gianni, Serena Ruggieri, Claudia Piervincenzi, Nikolaos Petsas**

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

**Massimo Filippi**, *Neuroimaging Research Unit, Istituto Scientifico San Raffaele, Università "Vita-Salute" San Raffaele, Milano, Italia*

**Nicola De Stefano**, *Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche, Neurologiche, Metaboliche e dell'Invecchiamento, Dipartimento Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Siena, Italia*

**Gioacchino Tedeschi**, *Centro di Alti Studi di Risonanza Magnetica SUN-FISM, Università degli studi della Campania 'Luigi Vanvitelli', Napoli, Italia*

## PREMESSE E OBIETTIVI

La disabilità clinica dei pazienti con sclerosi multipla (SM) non sempre può essere spiegato con il danno della struttura cerebrale. La teoria spiega che questa non-corrispondenza è dovuta alla funzionalità cerebrale, che fa in modo che le aree del cervello, anche non contigue, continuino a comunicare, anche se la struttura che le collega è rovinata. Lo scopo del progetto è stato quello di validare un modello non lineare per spiegare nella SM la combinazione del danno strutturale, la riorganizzazione funzionale e l'accumulo di disabilità nel tempo in una vasta popolazione di persone con SM. Nello specifico, l'unità di Roma collabora con le altre unità nell'ambito di un progetto speciale multicentrico, in cui si vuole 1. valutare se l'esaurimento dei meccanismi funzionali adattativi corrisponde all'inizio dell'accumulo di disabilità; 2. individuare le strutture cerebrali per le quali il modello si adatta al meglio, come possibili bersagli terapeutici per la riabilitazione o la farmacoterapia.

## RISULTATI

Durante questo quarto anno, si è ampliato il database delle immagini di risonanza magnetica (RM) e dati clinici, nonché neuropsicologici, dei pazienti con SM e di persone sane, che, negli studi, vengono usate come controlli per in-

vestigare la deviazione dalla normalità. Questi nuovi dati sono stati innanzitutto anonimizzati, per evitare violazioni della privacy, ed in seguito le immagini RM strutturali sono state controllate, specialmente per evitare artefatti nelle immagini utilizzate solo per scopi di ricerca, analizzate per riconoscere le lesioni della materia bianca, che sono una caratteristica fondamentale della SM. Inoltre, le immagini RM strutturali e funzionali sono state ulteriormente controllate ed analizzate nell'ambito di studi multicentrici, che quindi prevedono un'armonizzazione dei dati al fine di renderli comparabili, ovvero indipendenti dal centro di acquisizione.

## CONCLUSIONI

In conclusione, si sono implementate procedure per analizzare automaticamente le immagini RM cerebrali sia strutturali che funzionali, provenienti da diversi centri di cura, nei pazienti con SM. Questo permetterà di produrre studi con risultati più robusti rispetto a studi eseguiti in singoli centri, evidenziando l'importanza dei database da più centri. Inoltre, avere delle procedure automatiche di analisi unificate fra i singoli centri che fanno riferimento al database INNI sarà utile come riferimento nei futuri studi.

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

## INTRODUCTION AND AIMS

Clinical disability of patients with multiple sclerosis (MS) cannot always be explained by the damage of the brain structure. The theory explains that this mismatch is due to brain function, which allows areas of the brain, even if they are not contiguous, to continue communicating, even if the structure that connects them is damaged. The aim of the project was to validate a non-linear model to explain the combination of structural damage, functional reorganization and accumulation of disability over time in a large population of patients with MS. Specifically, the unit of Rome cooperates with the other units within the framework of a special multicentric project with the goal of: 1. evaluating whether the exhaustion of functional adaptive mechanisms corresponds to the beginning of the accumulation of disabilities; 2. identifying the brain structures for which the model fits best, as possible therapeutic targets for rehabilitation or pharmacotherapy.

## RESULTS

During this fourth year, we have expanded the database of magnetic resonance images (MRI) and clinical as well as neuropsychological data of patients with MS and healthy

people, which, in studies, are used as controls to investigate deviation from normality. These new data were first anonymized, to avoid privacy violations, and then the structural MR images were checked, especially to avoid artifacts in the images used only for research purposes, analyzed to recognize white matter lesions, which are a key feature of MS. Furthermore, the structural and functional MR images were further checked and analyzed in the context of multi-center studies, which therefore provide for a harmonization of the data in order to make them comparable, i.e., independent of the acquisition center.

## CONCLUSIONS

In conclusion, procedures have been implemented to automatically analyze both structural and functional brain MR images of patients with MS from different treatment centers. This will allow studies with more robust results than studies performed in single centres, highlighting the importance of databases from multiple centres. Furthermore, having unified automated analysis procedures across individual centers referencing the INNI database will be useful for reference in future studies.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Storelli L, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Rocca MA, Filippi M; INNI Network. *Methods for Brain Atrophy MR Quantification in Multiple Sclerosis: Application to the Multicenter INNI Dataset*. *J Magn Reson Imaging*. 2023 Jan 20. doi: 10.1002/jmri.28616. Online ahead of print
- De Rosa AP, Esposito F, Valsasina P, d'Ambrosio A, Bisecco A, Rocca MA, Tommasin S, Marzi C, De Stefano N, Battaglini M, Pantano P, Cirillo M, Tedeschi G, Filippi M, Gallo A; INNI Network. *Resting-state functional MRI in multicenter studies on multiple sclerosis: a report on raw data quality and functional connectivity features from the Italian Neuroimaging Network Initiative*. *J Neurol*. 2023 Feb;270(2):1047-1066. doi: 10.1007/s00415-022-11479-z
- Marzi C, d'Ambrosio A, Diciotti S, Bisecco A, Altieri M, Filippi M, Rocca MA, Storelli L, Pantano P, Tommasin S, Cortese R, De Stefano N, Tedeschi G, Gallo A; INNI Network. *Prediction of the information processing speed performance in multiple sclerosis using a machine learning approach in a large multicenter magnetic resonance imaging data set*. *Hum Brain Mapp*. 2023 Jan;44(1):186-202. doi: 10.1002/hbm.26106. Epub 2022 Oct 18
- Pagani E, Storelli L, Pantano P, Petsas N, Tedeschi G, Gallo A, De Stefano N, Battaglini M, Rocca MA, Filippi M; INNI Network. *Multicenter data harmonization for regional brain atrophy and application in multiple sclerosis*. *J Neurol*. 2023 Jan;270(1):446-459. doi: 10.1007/s00415-022-11387-2. Epub 2022 Sep 24

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



## Nicola De Stefano

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Siena Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Marco Battaglini, Rosa Cortese, Maria Laura Stromillo, Domenico Plantone, Ludovico Luchetti, Matteo Leoncini, Giordano Gentile**

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

**Antonio Gallo, Gioacchino Tedeschi**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate (DAMSS), Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Serena Ruggeri, Patrizia Pantano**, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

**Elisabetta Pagani, Maria Assunta Rocca, Massimo Filippi**, Unità di Ricerca di Neuroimmagini, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

### INNI NETWORK

**Loredana Storelli, Mauro Sibilìa**, Unità di Ricerca di Neuroimmagini, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

**Claudia Piervincenzi, Nikolaos Petsas**, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

## INTRODUZIONE E OBIETTIVI

L'atrofia dell'ippocampo sembra avere un ruolo rilevante nella sclerosi multipla (SM), in particolare in associazione con disturbi della memoria. Recenti studi hanno evidenziato che i sottocampi ippocampali sono coinvolti in modo diverso durante le differenti fasi della malattia. Tuttavia, gli studi attualmente disponibili sui correlati strutturali e funzionali del danno ippocampale e dei suoi sottocampi nelle fasi precoci di SM sono scarsi. In questo studio ci siamo concentrati sui pazienti nelle prime fasi di SM con l'obiettivo principale di (i) valutare l'atrofia ippocampale utilizzando la risonanza magnetica (RM) di un ampio campione di dati multicentrici e (ii) indagare se, nelle fasi iniziali della malattia, i cambiamenti volumetrici dell'ippocampo globale e regionale possono essere associati a compromissione della memoria.

## METODI

Dal dataset dell'Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI), sono state selezionate le RM encefalo con sequenze 3D-T1W volumetriche acquisite a 3T di i) 219 pazienti con SM precoce (durata della malattia  $\leq 5$ a) recidivante-remittente (RR) (150F, 34a  $\pm 10$ , EDSS: 1.5 [1-2])

sottoposti a Selective Reminding Test (SRT) e Spatial Recall Test (SPART) e ii) 246 controlli sani (CS) matchati per età e sesso (133F, 34y  $\pm 9$ ). Le maschere binarizzate dell'ippocampo sinistro e destro sono state ottenute seguendo il protocollo EADC-ADNI. È stata eseguita una analisi basata su voxel (VBM) per selezionare le aree ippocampali atrofiche a livello regionale nella SMRR e per selezionare, all'interno delle aree regionali significativamente atrofiche nella SMRR, i voxel correlati ai punteggi delle scale di memoria. Infine, proiettando le regioni clinicamente significative dell'ippocampo nello spazio nativo, sono state ulteriormente valutate le correlazioni tra i volumi stratificati per i sottocampi (ottenuti utilizzando il software FreeSurfer) e i punteggi clinici. Vengono riportati risultati significativi ( $p < 0,05$ , corretti per confronti multipli quando necessario).

## RISULTATI

*Differenze nei volumi dell'ippocampo tra SMRR in fase precoce e CS e correlazioni con i test di memoria*

I pazienti con SMRR in fase precoce hanno mostrato volumi inferiori nell'ippocampo globale, destro e sinistro (tutti  $p < 0,001$ ) rispetto ai CS. Nella SMRR in fase preco-

ce, punteggi più compromessi ai test SRT e SPART erano associati a volumi ippocampali inferiori, in particolare sul lato destro (tutti  $p < 0,001$ ).

#### Analisi basata su voxel

I risultati dell'analisi VBM hanno mostrato 4225 voxel significativamente più atrofici in SMRR rispetto ai CS, 2262 nell'ippocampo destro e 1983 nell'ippocampo sinistro. Tutti i sottocampi ippocampali erano coinvolti, anche se in diverse entità, con la massima riduzione di volume del subiculum (destro:  $700 \pm 108$  mm<sup>3</sup>; sinistro:  $719 \pm 119$  mm<sup>3</sup>), corno di ammore (CA)1 (destro:  $670 \pm 114$  mm<sup>3</sup>; sinistro:  $633 \pm 119$  mm<sup>3</sup>) e CA4 (destra:  $700 \pm 108$  mm<sup>3</sup>; sinistra:  $719 \pm 119$  mm<sup>3</sup>) e coda (destra:  $626 \pm 90$  mm<sup>3</sup>; sinistra:  $588 \pm 85$  mm<sup>3</sup>).

Entrambi i punteggi SRT-CLTR e SPART-recall correlavano con i voxel dell'ippocampo destro, localizzati in CA (1-3-4) e coda (numero di voxel significativi per SRT-CLTR: 146; numero di voxel significativi per SPART-recall: 59).

### CONCLUSIONI

Abbiamo riscontrato che l'atrofia dell'ippocampo è una caratteristica distintiva delle prime fasi della SM ed è un marcatore affidabile di compromissione della memoria.

In particolare, quando abbiamo eseguito l'analisi sui sottocampi ippocampali per esplorare la loro diversa vulnerabilità ai meccanismi patogenetici correlati alla SM, abbiamo identificato un ruolo rilevante della regione CA suggerendo come l'analisi dei sottocampi ippocampali possa essere uno strumento promettente per valutare il danno ippocampale in-vivo e la relativa compromissione della memoria.

A nostra conoscenza, questo è il primo studio multicentrico relativamente ampio che valuta i volumi ippocampali totali e regionali nella SM. La procedura di analisi di RM utilizzata nel nostro studio ha dimostrato di essere facilmente eseguibile. I risultati riportati suggeriscono che il volume dell'ippocampo può rappresentare un marcatore di imaging affidabile della compromissione della memoria dalle prime fasi della SM da poter utilizzare in un contesto multicentrico come uno studio clinico.

Inoltre, l'evidenza del coinvolgimento della CA destra e della coda nelle prime fasi della SM suggerisce che questa regione specifica può essere un marcatore candidato per strategie di riabilitazione cognitiva per migliorare la memoria o può essere utilizzata come indicatore di effetti benefici globali delle terapie generali.

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

### INTRODUCTION AND AIMS

Hippocampal atrophy can be relevant in multiple sclerosis (MS), particularly in association with memory impairment. Evidence suggests that hippocampal subfields are differently involved throughout the disease stages. However, studies on the structural and functional correlates of hippocampal damage and its subfields in the early disease course are scattered. In this study we focused on patients at the early stages of MS with the main aim to (i) assess MRI-derived hippocampal atrophy from a large multicenter dataset and (ii) to investigate whether, at these initial disease stages, global and regional hippocampal changes can be associated with memory impairment.

### METHODS

From the Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) dataset, we selected volumetric 3D-T1W brain images acquired at 3T of i) 219 early (disease duration  $\leq 5$ y) Relapsing-Remitting (RR) RRMS patients (150F,  $34y \pm 10$ , EDSS: 1.5 [1-2]) who underwent Selective Reminding Test (SRT) and Spatial Recall Test (SPART) and ii) 246 age and sex-matched healthy controls (HC) (133F,  $34y \pm 9$ ). Left and right hippocampal binarized masks were obtained following the EADC-ADNI protocol. Voxel-based analysis (VBM)

was performed to select regionally atrophied hippocampal areas in RRMS and to select, within the regional areas significantly atrophied in RRMS, the voxels correlating with clinical scores. Finally, projecting back hippocampal clinically significant regions in the native space, the correlations between volumes stratified for subfields (as obtained by using FreeSurfer) and clinical scores was further evaluated. Significant results ( $p < 0.05$ , corrected for multiple comparisons when necessary) are reported.

### RESULTS

#### *Differences in hippocampal volumes between early RRMS and HC and correlations with memory tests*

Early RRMS showed lower volumes in the whole, right and left (all  $p < 0.001$ ) hippocampi compared to HCs. In early RRMS, worse scores in SRT and SPART performance were associated with lower hippocampal volumes, particularly on the right side (all  $p < 0.001$ ).

#### *Voxel based analysis*

Results of the VBM analysis showed 4225 atrophic voxels between RRMS and HC, 2262 in the right and 1983 in the left hippocampus. All hippocampal subfields were involved at different extents, with the highest volume reduction of

the subiculum (right:  $700 \pm 108 \text{ mm}^3$ ; left:  $719 \pm 119 \text{ mm}^3$ ), cornus ammonis (CA)1 (right:  $670 \pm 114 \text{ mm}^3$ ; left:  $633 \pm 119 \text{ mm}^3$ ) and CA4 (right:  $700 \pm 108 \text{ mm}^3$ ; left:  $719 \pm 119 \text{ mm}^3$ ), tail (right:  $626 \pm 90 \text{ mm}^3$ ; left:  $588 \pm 85 \text{ mm}^3$ ).

Both SRT-CLTR and SPART-recall scores correlated with voxels of the right hippocampus, located in CA(1-3-4) and Tail (number of significant voxels for SRT-CLTR: 146; number of significant voxels for SPART-recall: 59).

## CONCLUSIONS

We found that hippocampal atrophy is a distinctive feature of the early stages of MS and is a reliable marker of memory impairment. In particular, when we performed the analysis on hippocampal subfields to explore both their different vulnerability to MS-related pathogenic mechanisms, we found a relevant role of the CA region suggesting

that the analysis of hippocampal subfields can be a promising tool to assess hippocampal damage in-vivo and its related memory impairment.

To our knowledge, this is the first relatively large, multicenter study assessing total and regional hippocampal volumes in MS. The MRI analysis procedure used here has shown to be feasible and the reported results suggest that hippocampal volume can represent a reliable imaging marker of memory impairment from the early stages of MS to be used in a multicenter setting such as a clinical trials.

In addition, the evidence of right CA and tail involvement in the early phases of MS suggests that this specific region may be a candidate target for either cognitive rehabilitation strategies to improve memory or can be used as a marker of global beneficial effects of general therapies.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Plantone D, Battaglini M, Cortese R, Luchetti L, Leoncini M, Gentile G, Gallo A, Tedeschi G, Ruggieri S, Pantano P, Pagani E, Rocca M, Filippi M, De Stefano N. Hippocampal atrophy in patients with early multiple sclerosis and its correlation to memory impairment" Oral presentation at 52nd Congress of Italian Neurological Society - Milano (Italy) 3-6 December 2022*
- *Poster presentation at 38th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis - Amsterdam (The Netherlands) 26-28 October 2022*

# Predizione della performance cognitiva nei pazienti con sclerosi multipla utilizzando un approccio di intelligenza artificiale applicato ad un esteso data set multicentrico di immagini di risonanza magnetica



## Gioacchino Tedeschi, Antonio Gallo

Centro SM e Unità di Ricerca 3T-MRI, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate (DAMSS), Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Alessandro d'Ambrosio, Chiara Marzi, Alvino Biseco, Manuela Altieri**, Centro SM e Unità di Ricerca 3T-MRI, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate (DAMSS), Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

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

\* **Massimo Filippi, Maria Assunta Rocca, Loredana Storelli**, Unità di Ricerca di Neuroimmagini, Divisione di Neuroscienze, Università Vita-Salute San Raffaele, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

\* **Patrizia Pantano**, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia, IRCCS NEUROMED, Pozzilli, Italia

\* **Nicola De Stefano**, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

**Stefano Diciotti**, Dipartimento di Ingegneria dell'Energia Elettrica e dell'Informazione "Guglielmo Marconi" Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna, Italia

\* **Centri del progetto speciale multicentrico INNI**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Gran parte dei pazienti con sclerosi multipla (SM), indipendentemente dal fenotipo clinico, sviluppa un decadimento cognitivo. I deficit cognitivi, spesso misconosciuti, hanno un impatto importante sulla vita sociale lavorativa e più in generale sulla qualità della vita dei pazienti con SM. Le tecniche di risonanza magnetica (RM) hanno notevolmente migliorato la nostra comprensione dei meccanismi associati ai deficit cognitivi nella SM. Tuttavia, quali siano i marker strutturali di RM maggiormente coinvolti nel determinare il decadimento della performance cognitiva nei pazienti con SM è ancora poco chiaro ed è probabilmente uno dei fattori che contribuisce al ben noto paradosso clinico-radiologico (inteso come discrepanza tra caratteristiche cliniche e radiologiche nei pazienti con SM).

Un approccio che integri diverse misure RM-derivate per fare inferenza sui pattern di danno cerebrale correlati alla riduzione della performance cognitiva dovrebbe aiutarci a comprendere meglio i substrati patologici coinvolti nel-

la genesi del decadimento cognitivo osservato in corso di SM. A tal proposito negli ultimi anni sono emerse tecniche di intelligenza artificiale (IA) e di machine learning (ML) molto promettenti per l'identificazione di combinazioni di predittori clinico-demografici e radiologici in grado di predire con accuratezza determinati outcome.

Il nostro obiettivo, quindi, è stato quello di utilizzare tecniche di IA per selezionare le misure strutturali di RM encefalica che, insieme a dati clinici e demografici, ci permettevano di predire meglio, a livello individuale, lo stato cognitivo dei pazienti con SM.

## RISULTATI

Per la predizione della classe cognitiva (integro vs deteriorato, utilizzando il test SDMT come screening) la migliore performance è stata raggiunta dall'algoritmo di classificazione XGBoost allenato con solo 3 caratteristiche: volume talamico, punteggio EDSS, volume delle lesioni.

Per la predizione del punteggio SDMT (quindi della performance cognitiva), la migliore performance è stata raggiunta dall'algoritmo di regressione XGBoost allenato con età, punteggio EDSS, volume talamico, ippocampale e delle lesioni.

## CONCLUSIONI

*Impatto sulla ricerca nel campo della fisiopatologia dei deficit cognitivi nella SM*

I nostri risultati confermano che il danno diffuso dell'architettura encefalica legato alla SM può portare a conseguenze sullo stato cognitivo dei pazienti difficilmente prevedibili utilizzando solo dati clinici. Per quanto riguarda il volume delle lesioni, benché rientri tra i principali predittori della performance cognitiva, non riesce a spiegare completamente le severità del decadimento cognitivo, confermando ancora una volta il concetto di paradosso

clinico-radiologico osservato nella SM. Il nostro approccio di IA/ML, utilizzando un esteso pool di misure strutturali encefaliche estratte da un ampio data set multicentrico di RM ha mostrato un'ottima performance nel predire lo stato cognitivo dei pazienti con SM a livello del singolo soggetto. Questo approccio innovativo ha confermato come il coinvolgimento di alcuni "hubs" cognitivi encefalici, come il talamo e l'ippocampo, sia più rilevante del danno focale a carico della sostanza bianca nel predire la performance cognitiva dei pazienti con SM.

Lo studio della fisiopatologia del deficit cognitivo in corso di SM attraverso l'applicazione di metodiche di AI promette di essere, nel prossimo futuro, un approccio molto efficace per chiarire molti dei punti ancora oscuri riguardo la genesi e l'evoluzione del suddetto deficit che, come è ben noto, ha un impatto negativo molto significativo sulla qualità di vita dei pazienti con SM.

# Prediction of the information processing speed performance in multiple sclerosis patients using a machine learning approach in a large multicenter magnetic resonance imaging data set

## INTRODUCTION AND AIMS

A large proportion of patients with MS, regardless of the clinical phenotype, experiences cognitive deficits. Cognitive impairment (CI), sometimes neglected, has a strong negative impact on social activities, employment status, and more generally on daily living and quality of life of these patients. Magnetic resonance imaging (MRI) has markedly improved our understanding of the mechanisms associated with CI in MS patients. However, which structural MRI markers are the most closely related to the cognitive performance of MS patients is still unclear, underlying the well know clinico-radiological paradox in MS. An approach that integrates multiple MRI-derived metrics to make inference about brain damage patterns related to cognitive performance should better capture the complexity behind CI in MS, likely subtended by multiple biological processes acting together, thus helping in the disentanglement of the clinical-radiological paradox.

In the last few years, machine learning (ML) techniques have emerged as a very promising approach for studying high-dimensional data with a hidden complex pattern. Our aim was to use ML techniques to select the brain structural MRI volumes that, along with demographic and clinical data, better predict cognitive status in patients with MS, assessed by SDMT score.

## RESULTS

For the prediction of the cognitive class (impaired – unimpaired, based on the SDMT screening test) the best performance has been achieved by XGBoost classifier trained with only three features, i.e., thalamus volume, EDSS scores, and T2LV.

For the prediction of the SDMT z-scores, the best performance has been achieved by the XGBoost regressor trained with age, EDSS scores, thalamus, hippocampus, and lesion volumes.

## CONCLUSIONS

*Impact on MS research in the field of pathophysiology of cognitive deficits in MS*

Our findings confirm that the diffuse damage of the structural brain architecture subtended to MS pathology may predict consequences on the cognitive status of MS patients, which cannot be sufficiently explained using clinical data alone. As regards WM T2LV, although it was retained in our models among the main predictors of the cognitive status in MS patients, it could not fully explain the severity of cognitive impairment in MS patients, once again confirming the concept of the "clinic-radiological" paradox observed in MS.

Our ML approach using a comprehensive set of brain structural measures extracted from a large multicenter 3T-MRI dataset showed a good performance in predicting CI in MS at a single subject level. This novel approach confirmed how the involvement of some cognitive hubs of the brain, such as the thalamus and the hippocampus, are more relevant than focal WM damage (i.e., T2LV) in

the prediction of cognitive performance in MS. The study of the pathophysiology of cognitive deficit in MS through the application of AI methods promises to be, in the near future, a very effective approach to clarify many of the still obscure points regarding the genesis and evolution of the aforementioned deficit, which has a very dramatic effect on the quality of life of MS patients.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Marzi C\*, d'Ambrosio A\*, Diciotti S, Bisecco A, Altieri M, Filippi M, Rocca MA, Storelli L, Pantano P, Tommasin S, Cortese R, De Stefano N, Tedeschi G, Gallo A and the INNI network. Prediction of the information processing speed performance in multiple sclerosis using a machine learning approach in a large multi-center MRI dataset. *Hum Brain Mapp.* 2023 Jan;44(1):186-202. doi: 10.1002/hbm.26106. Epub 2022 Oct 18
- d'Ambrosio A, Marzi C, Bisecco A, Diciotti S, Altieri M, Battaglini M, De Stefano N, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Rocca MA, Storelli L, Filippi M, Tedeschi G, Gallo A, and the Italian Neuroimaging Network Initiative. Selecting structural MRI predictors of cognitive status in MS patients through a machine learning approach applied to a large multicenter MS population. 2021 European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Meeting
- d'Ambrosio A, Marzi C, Bisecco A, Diciotti S, Altieri M, Battaglini M, De Stefano N, Pagani E, Pantano P, Piervincenzi C, Rocca MA, Storelli L, Filippi M, Tedeschi G, Gallo A, and the Italian Neuroimaging Network Initiative. Selecting structural MRI predictors of cognitive status in MS patients through a machine learning approach applied to a large multicenter MS population. 2022 Italian Society of Neurology (SIN) Meeting, Milano, 3-6 Dec. 2022

---

# **Registro Italiano Sclerosi Multipla e Patologie Correlate**

Multiple Sclerosis  
Italian Register  
and Related Disorders

---

# Indice / Index

## REGISTRO ITALIANO SCLEROSI MULTIPLA E PATOLOGIE CORRELATE

## MULTIPLE SCLEROSIS ITALIAN REGISTER AND RELATED DISORDERS

<b>Indice / Index</b>	<b>187</b>
<b>Introduzione / Introduction</b>	<b>190</b>
<b>Progetti terminati / Ended projects</b>	<b>200</b>
<b>TERAPIA / THERAPY</b>	<b>200</b>
<i>Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta al trattamento</i> <i>Prognostic factors and predictive models of treatment response</i>	<b>200</b>
<b>Roberto Bergamaschi</b> <b>Predizione precoce di evoluzione sfavorevole in pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS).</b> <b>Studio RECIS (stima del rischio in CIS)</b> Early prediction of unfavorable evolution of clinically isolated syndrome (CIS) patients. The RECIS (risk estimate for CIS) study	<b>200</b>
<b>Maria Pia Amato</b> <b>Definizione dei predittori precoci clinici e di risonanza magnetica di risposta al trattamento nei pazienti con sclerosi multipla pediatrica</b> Assessing early clinical and MRI predictors of treatment response in pediatric multiple sclerosis patients	<b>202</b>
<i>Efficacia del trattamento a breve e a lungo termine / Short and long-term treatment effectiveness</i>	<b>205</b>
<b>Damiano Paolicelli</b> <b>Caratterizzare il rischio di eventi avversi gravi durante il sequencing dei trattamenti nei pazienti con Sclerosi Multipla: analisi di coorte basata sul Registro Italiano Sclerosi Multipla</b> PROfiling the risk of severe adverse events during sequencing therapies in patients with multiple sclerosis: an observational cohort analysis based on Italian Multiple Sclerosis Registry	<b>205</b>
<b>Maria Trojano</b> <b>Rete internazionale Big Multiple Sclerosis Data (BMSD)</b> Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network	<b>208</b>
<i>Algoritmi di trattamento e switch / Treatment algorithms and switches</i>	<b>212</b>
<b>Maria Trojano</b> <b>Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano Sclerosi Multipla per valutare l'impatto dell'attività di malattia nelle scelte terapeutiche durante le fasi recidivante e progressiva attiva di SM</b> EPID-MS Evaluation of the drivers of the therapy switch in active RRMS and active SPMS patients	<b>212</b>

<i>Efficacia comparativa, sicurezza tra trattamenti / Comparative effectiveness, safety between treatments</i>	<b>217</b>
<b>Matilde Inglese</b>	<b>217</b>
<b>Trapianto di cellule staminali ematopoietiche in persone con sclerosi multipla progressiva secondaria attiva: uno studio comparativo con pazienti di controllo del Registro Italiano Sclerosi Multipla</b>	
Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Secondary Progressive Multiple Sclerosis: a comparative study with matched control patients from the Italian Multiple Sclerosis Register	
<i>Aderenza al trattamento / Treatment adherence</i>	<b>221</b>
<b>Antonio Gallo</b>	<b>221</b>
<b>Studio OCREVID: L'utilizzo di OCRElizumab durante la pandemia da COVID-19 in Italia</b>	
OCREVID Study: the management of OCRElizumab during the COVID-19 pandemic in Italy	
<b>EPIDEMIOLOGIA ANALITICA / ANALYTICAL EPIDEMIOLOGY</b>	<b>224</b>
<i>Fattori di rischio / Risk factors</i>	<b>224</b>
<b>Marco Capobianco</b>	<b>224</b>
<b>Attività di malattia nella sclerosi multipla e pandemia da SARS-COV2: studio di popolazione dal Registro Italiano Sclerosi Multipla (RISM)</b>	
Multiple sclerosis disease activity and SARS-COV2 pandemic: a population based study from the Italian MS Registry	

Il Registro Italiano Sclerosi Multipla e patologie correlate è realizzato con il contributo di FISM, 5permille e donazioni, e delle aziende:

*The Italian Multiple Sclerosis Registry and related disorders is supported by the contribution of FISM, the Italian "5x1000" Income tax, donations, and the following companies:*



# Registro Italiano Sclerosi Multipla e Patologie Correlate

Il Registro Italiano Sclerosi Multipla e Patologie Correlate è uno dei Progetti Speciali di punta della ricerca sostenuta da AISM e dalla sua Fondazione che ha **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.**

## LA STORIA DEL REGISTRO ITALIANO SM E PATOLOGIE CORRELATE

Dal 2000 è iniziata la raccolta italiana di dati clinici sulla SM nei Centri clinici SM aderenti ad un progetto di ricerca su un database nazionale dedicato alla sclerosi multipla (the Italian MS Database Network).

Dal 2014 FISM, in collaborazione con l'Università degli Studi di Bari e i Centri clinici italiani SM, ha promosso e finanziato la creazione del Registro Italiano SM.

Dal 2021, per una maggiore inclusività, la denominazione del Registro è stata modificata in: Registro Italiano di Sclerosi Multipla e Patologie Correlate. A questo proposito è stato sviluppato un nuovo modulo per la raccolta di informazioni su forme rare di malattie demielinizzanti: malattie demielinizzanti e disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD), come la neuromielite ottica e le patologie associate alla presenza di anticorpi anti-MOG (MOGAD).

**177 Centri clinici** italiani hanno aderito al progetto e, ad oggi, il Registro raccoglie le storie cliniche di **circa 81.700 persone con SM.**

Il Registro è dunque pronto a diventare un vero strumento di ricerca scientifica utile per lo sviluppo di studi epidemiologici e clinici oltre a essere un valido strumento per la programmazione sanitaria.

Il Registro permetterà la promozione dell'equità di accesso alle cure per le persone con SM, attraverso il confronto delle pratiche assistenziali dei diversi centri oltre all'analisi delle politiche assistenziali di carattere nazionale e locale.

## AREE PRIORITARIE

Il Comitato Scientifico del Progetto Registro Italiano SM ha individuato due aree prioritarie:

- **SANITÀ PUBBLICA.** Necessità di impostare un censimento delle persone con SM e patologie correlate, 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, ottimizzazione dell'assistenza sanitaria, disponibilità di informazioni socio-assistenziali e valutazione dell'accesso a cure e servizi sanitari sul territorio italiano.
- **PROGETTI DI RICERCA.** Necessità di raccogliere informazioni utili per la pianificazione di studi di ricerca per specifiche progettualità. In particolare, studi sull'epidemiologia della malattia e sulla prognosi, sull'ottimizzazione del trattamento (efficacia e sicurezza), sul decorso della malattia, sugli stadi preclinici/subclinici della malattia (CIS e RIS).

## INFRASTRUTTURE

### LA GOVERNANCE

La governance del Registro Italiano SM e Patologie Correlate comprende un Comitato Esecutivo (presieduto da FISM e dall'Università di Bari) con ruolo amministrativo e organizzativo e un Comitato Scientifico (comprendente clinici, statistici, rappresentanti dei centri SM e della Società Italiana di Neurologia) che sovrintende alle iniziative scientifiche, promuove specifici progetti strategici e approva le richieste di accesso ai dati centralizzati per ulteriori progetti di ricerca. L'attuale **Comitato Scientifico** è composto da:

**Maria Trojano** (rappresentante Università di Bari, Presidente)

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari

**Mario Alberto Battaglia** (rappresentante FISM, Vicepresidente)

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM, Genova

**Paola Mosconi** (rappresentante Istituto Mario Negri)

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano

**Claudio Gasperini** (rappresentante Società Italiana di Neurologia, SIN)

Dipartimento di Neuroscienze, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

**Eleonora Cocco** (rappresentante Centri clinici)  
Centro Regionale per la diagnosi e la cura della Sclerosi Multipla ASL8 P.O. Binaghi, Cagliari

**Matilde Inglese** (rappresentante Centri clinici)  
Centro per lo studio e la cura della Sclerosi Multipla e Malattie Demielinizzanti - Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno - Infantili, Clinica Neurologica - Ospedale Policlinico San Martino (DiNOGMI), Genova

**Carla Tortorella** (rappresentante Centri clinici)  
Centro Sclerosi Multipla - Az. Osp. S. Camillo Forlanini, Roma

**Marco Capobianco** (segretario)  
Centro Sclerosi Multipla, SC Neurologia, AO Santa Croce e Carle, Cuneo

**Maria Pia Amato** (esperto)  
Dipartimento di NEUROFARBA, Università di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

**Giancarlo Comi** (esperto)  
Università Vita-Salute, San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

**Massimo Filippi** (esperto)  
Centro Sclerosi Multipla - Ospedale San Raffaele, Milano

## STRUTTURE OPERATIVE

Per il Registro operano due strutture operative: la Struttura Amministrativa e di Coordinamento (SAC), con sede presso la FISM di Genova e la Struttura Tecnico Operativa (STO), con sede presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS di Milano.

## I NETWORK DEL REGISTRO

### NETWORK DI CENTRI CLINICI PER LA SM

I Centri per la SM sono riconosciuti come componenti chiave per la cura della SM in Italia. Ci sono circa 240 centri per la SM di varie dimensioni e spesso si trovano all'interno di Dipartimenti di Neurologia degli ospedali pubblici. Attualmente circa il 74% dei centri italiani per la SM ha aderito al Registro.

### NETWORK DEGLI ASSISTENTI DI RICERCA

Con l'obiettivo di aumentare la qualità della raccolta e dell'inserimento dei dati, è stata formata *ad hoc* una rete di giovani assistenti di ricerca. Attualmente 18 assistenti di ricerca sono attivi in 14 regioni italiane (circa 100 centri) e sono assegnati a uno o più centri in base al loro contributo al progetto in termini di numero di pazienti registrati e distribuzione geografica. Le loro attività comprendono: supportare la fase di avvio del progetto e la sua attuazione puntuale presso i centri SM e garantire una raccolta e una gestione standardizzate dei dati.

### COMITATI CONSULTIVI DEGLI STAKEHOLDER

Per soddisfare le priorità strategiche del Registro, gli stakeholder comprese le industrie sono coinvolti attraverso un forum consultivo. Attualmente è attivo un Industry Advisory Board, che include le principali compagnie farmaceutiche che si occupano di SM.

## SOFTWARE DEDICATO

Durante i primi anni, il Registro ha utilizzato un software di soluzione client-server (software iMed<sup>®</sup>), una cartella medica computerizzata offline che necessitava di un caricamento periodico da parte dei Centri clinici. A fine 2016 è stato sviluppato un nuovo software web-based. Da aprile 2021, il Registro utilizza esclusivamente il nuovo software modulare basato sul web. Attualmente la versione del software è 3.0. L'accesso al software avviene attraverso l'area riservata del sito web del progetto (<https://www.registroitalianosm.it/>).

### COMPETENZE DELLA NUOVA PIATTAFORMA

- **Focalizzata sul paziente:** il paziente viene registrato una sola volta nella banca dati attraverso un codice fiscale (codice personale identificativo univoco). Questo è un punto cruciale perché l'unicità del soggetto SM registrato produce un miglioramento significativo nella messa in comune dei dati nella banca dati centrale. Nessun caso duplicato è presente nel database.

- **Pratica:** l'inserimento dei dati è possibile attraverso diversi dispositivi (PC, cellulare, tablet).
- **Sicura:** il sistema rispetta gli standard richiesti dal Regolamento Generale sulla Protezione dei Dati dell'Unione Europea (GDPR) 2016/679 e ogni centro inserisce i dati attraverso una password personalizzata.
- **Facilmente accessibile:** è sufficiente un accesso a Internet.
- **Standardizzata:** il database utilizza una codifica standardizzata.
- **Stampabile:** è possibile stampare un referto contenente le informazioni sul paziente.
- **Modulare:** è possibile aggiungere più moduli.

## STRUTTURA DEL SOFTWARE

Il database del Registro raccoglie un set di dati essenziali per caratterizzare il profilo clinico delle persone con SM più altre variabili incluse in moduli specifici come:

### Farmaci

Questa sezione è dedicata alla storia del trattamento del paziente. Questo modulo include il piano di gestione del rischio clinico per tutti i trattamenti modificanti la malattia. Inoltre gli eventi avversi e gli eventi avversi gravi sono codificati utilizzando il dizionario medico MedDRA, mentre le comorbidità sono codificate utilizzando la classificazione internazionale ICD9.

### Risonanza magnetica

Questa sezione è dedicata alle misure di risonanza magnetica convenzionale (RMI) (numeri di lesioni cerebrali in T2 e in T1 e Gd+T1).

### Strumentale

Questa sezione raccoglie informazioni su test di laboratorio (es. virologici, immunologici, di funzionalità tiroidea e altri test specifici), liquor, potenziali evocati, EEG, ECG.

### Covid-19

Questa sezione raccoglie informazioni relative all'infezione da Covid-19 come: diagnosi, gravità, esito e correlazione con farmaci modificanti la malattia (DMT) e vaccinazioni.

### NMOSD e MOGAD

Questa sezione è dedicata alle forme rare di malattie demielinizzanti e disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD) come la neuromielite ottica e le patologie associate alla presenza di anticorpi anti-MOG (MOGAD).

### Gravidanza

Questa sezione raccoglie informazioni riguardanti la gravidanza, gli outcome materni e fetali dei pazienti con SM e dei loro figli.

### SM a esordio pediatrico

Questa sezione raccoglie informazioni sulla SM a esordio pediatrico. Questo modulo include informazioni quali: fattori di rischio ambientale, vaccinazioni, funzionamento cognitivo nel tempo e caratteristiche specifiche legate alla risonanza magnetica.

## MONITORAGGIO DEI DATI

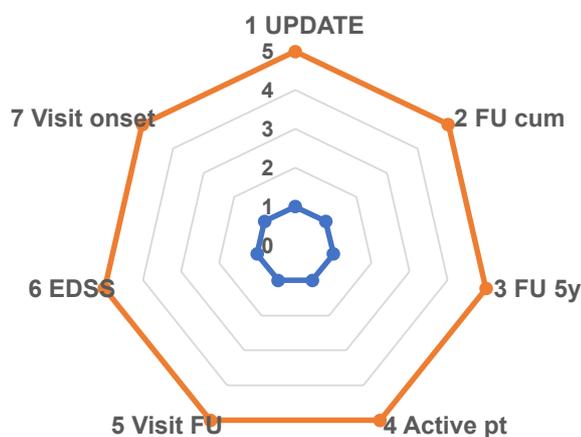
Per garantire un'elevata qualità delle informazioni raccolte i dati vengono monitorati centralmente. Sono stati implementati diversi strumenti di controllo al fine di aumentare la qualità e la generalizzazione dei dati raccolti. Periodicamente, tutti i centri vengono raggiunti con un report su tutti i dati raccolti e un report personalizzato con richieste sui dati mancanti o sulle incongruenze tra le variabili inserite. I controlli di qualità riguardano:

- **date:** presenza/assenza, completezza, anomalie e coerenza tra tutti i dati raccolti nel dataset
- **completezza:** valutazione complessiva del livello di completezza delle variabili incluse
- **accuratezza:** proporzione di variabili con valore corrispondente al loro range
- **consistenza:** congruenza con altre variabili.

Ogni 2 mesi gli assistenti di ricerca ricevono un aggiornamento dell'andamento dei centri che hanno in carico e lo condividono con il responsabile del centro partecipante. Quest'ultimo riceve mensilmente una comunicazione con aggiornamenti e chiarimenti riguardo l'inserimento di dati e le procedure inerenti il progetto.

Inoltre, è stato individuato e adottato un set di 7 indicatori di performance con l'obiettivo di migliorare la qualità, la completezza dell'indagine, la tempestività, la generalizzazione e la rappresentatività dei dati raccolti. Per ogni indicatore o dominio esaminato, a ciascun centro partecipante è stato assegnato un punteggio di cinque per la performance più alta, mentre sono

stati attribuiti punteggi da 4 a 1 per la performance progressivamente inferiore. Ogni 6 mesi, ogni centro partecipante riceve un report in cui i dati e gli indicatori di performance del proprio centro vengono confrontati con l'intero campione: in questo modo ogni centro può valutare le prestazioni più critiche e il livello di miglioramento nel tempo. Di seguito i 7 indicatori di performance e la loro rappresentazione grafica (grafico radar):



1. **UP DATE:** aggiornamento dei dati
2. **FU cum:** follow-up cumulativo per persona/anno
3. **FU 5y:** % di pazienti con follow-up maggiore di 5 anni
4. **Pt attivi:** almeno 1 visita negli ultimi 2 anni
5. **Visita FU:** almeno 1 visita ogni 6 mesi/Follow-up
6. **EDSS:** almeno 1 valutazione EDSS ogni 6 mesi/ Follow-up
7. **Visita esordio:** almeno 1 visita entro 1 anno dall'esordio

## L'INIZIATIVA EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY) PER I REGISTRI DEI PAZIENTI

I dati real world sono importanti in quanto offrono una raccolta di dati a lungo termine e consentono di valutare la storia del trattamento del paziente durante il decorso della malattia.

L'uso dei registri di malattia può fornire una migliore comprensione degli effetti della comorbidità sull'efficacia e sicurezza dei trattamenti che modificano la malattia. L'EMA è interessata ai dati real world relativi alla valutazione della sicurezza dei farmaci post-marketing (ovvero, studio sulla sicurezza post-autorizzazione - PASS). L'iniziativa internazionale di condivisione dei dati "Big MS Data Group network", che include il Registro Italiano SM e Patologie Correlate, è stata riconosciuta dall'EMA come un'iniziativa di alta qualità in grado di fornire dati per i progetti PASS.

Attualmente sono in corso tre progetti PASS basati sul Registro.

1. Uno studio osservazionale che utilizza i dati del programma statunitense Tysabri TOUCH e seleziona i Registri SM Europei per stimare il rischio di leucoencefalopatia multifocale progressiva e altre gravi infezioni opportunistiche tra i pazienti che sono stati esposti a un trattamento che modifica la malattia della sclerosi multipla prima del trattamento con **Tysabri (BIOGEN)**
2. Sorveglianza a lungo termine (studio MANUSCRIPT) di pazienti con sclerosi multipla trattati con **Ocrelizumab (ROCHE)**
3. Sorveglianza a lungo termine (studio CLARION) di **Cladribina orale** in pazienti con sclerosi multipla recidivante altamente attiva (**MERCK**)

## PROGETTI DI RICERCA BASATI SUI DATI DEL REGISTRO ITALIANO SM E PATOLOGIE CORRELATE

Attualmente sono 47 i progetti approvati, 29 completati e 18 in corso.

Le principali aree prioritarie dei progetti di ricerca sono:

- **Epidemiologia descrittiva** (prevalenza, incidenza e mortalità)
- **Epidemiologia analitica** (fattori di rischio, comorbidità e fattori prognostici)
- **Decorsi SM e patologie correlate** (benigno, RIS, CIS, forma progressiva, esordio pediatrico, esordio tardivo, forma aggressiva, NMOSD e MOGAD)
- **Terapia** (fattori prognostici e modelli predittivi di risposta al trattamento, aderenza al trattamento, efficacia del trattamento a breve e lungo termine, sicurezza, efficacia comparativa/sicurezza tra trattamenti, algoritmi di trattamento e switch).

Dal 2018 al 2022 sono state pubblicate oltre 25 pubblicazioni peer-reviewed su riviste internazionali.

Di seguito è riportata la lista dei 18 progetti in corso.

<b>Responsabile del progetto</b>	<b>Titolo del progetto</b>	<b>Area prioritaria</b>
<b>Giuseppe Fenu</b>	<i>Variazione delle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da SM con diagnosi tra il 1983 e il 2016</i>	<i>Epidemiologia descrittiva - prevalenza</i>
<b>Monica Ulivelli</b>	<i>Stato di immunizzazione verso le principali malattie trasmissibili -prevenibili da vaccino-, e sicurezza dei vaccini, in una coorte di pazienti con SM. Studio multicentrico Italiano</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori di rischio</i>
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<i>L'inquinamento atmosferico come possibile fattore di rischio della SM. Uno studio ecologico sulla popolazione Italiana (Studio AIRMUS)</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori di rischio</i>
<b>Giovanni Ristori</b>	<i>Prevenzione secondaria nella Sclerosi Multipla: il vaccino "Bacille Calmette-Guérin" (BCG) nei pazienti con Sindrome Radiologicamente Isolata (RIS)</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori di rischio</i>
<b>Jessica Frau</b>	<i>Valutazione dei fattori prognostici al basale in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da SM</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori prognostici</i>
<b>Maurizio Leone</b>	<i>Integrazione di dati genetici e fenotipici tra il data-base PROGEMUS e il Registro Italiano SM</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori prognostici</i>
<b>Marco Salvetti</b>	<i>Utilizzo di tecniche di Machine Learning per prevedere il decorso della SM recidivante-remittente nei singoli pazienti</i>	<i>Epidemiologia analitica - fattori prognostici</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Studio retrospettivo sulle caratteristiche cliniche e radiologiche dei pazienti ad esordio tardivo di sclerosi multipla (LOMS)</i>	<i>Decorsi SM e patologie correlate - esordio tardivo</i>
<b>Maria Pia Amato</b>	<i>Valutazione dell'efficacia in funzione dell'età, dei trattamenti per la sclerosi multipla in una coorte Real-Life</i>	<i>Terapia - fattori prognostici e modelli predittivi di risposte al trattamento</i>
<b>Massimo Filippi</b>	<i>Fattori predittivi di risposta alla terapia con cladribina in pazienti affetti da sclerosi multipla</i>	<i>Terapia - fattori prognostici e modelli predittivi di risposte al trattamento</i>
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<i>Nuova generazione di modulatori del recettore della sfingosina 1-fosfato (S1P) nella pratica clinica: uno studio real-world dal registro italiano della SM</i>	<i>Terapia - efficacia del trattamento a breve e lungo termine</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Studio retrospettivo multicentrico sulla valutazione dell'efficacia di ocrelizumab nei pazienti affetti da sclerosi multipla primariamente progressiva (OPPORTUNITY)</i>	<i>Terapia - efficacia del trattamento a breve e lungo termine</i>
<b>Emanuele D'Amico</b>	<i>Interrompere o continuare le terapie modificanti il decorso di malattia nella forma secondariamente progressiva di Sclerosi Multipla: uno studio di confronto sulle traiettorie di disabilità</i>	<i>Terapia - sicurezza</i>
<b>Tomas Kalincik</b>	<i>Tempistica ed efficacia comparativa delle terapie modificanti la malattia ad alta efficacia nella sclerosi multipla con esordio nell'infanzia</i>	<i>Terapia - efficacia comparativa/ sicurezza tra trattamenti</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Studio retrospettivo multicentrico sulla valutazione dell'efficacia di Rituximab nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla recidivante precedentemente trattati con farmaci ad elevata efficacia (RENEGADE)</i>	<i>Terapia - efficacia del trattamento a breve e lungo termine</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Studio retrospettivo multicentrico sulla valutazione delle caratteristiche cliniche e radiologiche dei pazienti affetti da Sclerosi Multipla secondariamente progressiva (ASPERA)</i>	<i>Epidemiologia analitica- fattori di rischio</i>
<b>Paola Cavalla</b>	<i>La pandemia SARS-CoV-2 come modello per valutare la relazione tra infezioni virali intercorrenti e attività della malattia nella Sclerosi Multipla: uno studio caso-controllo con propensity score matching</i>	<i>Epidemiologia analitica- fattori di rischio</i>
<b>Emilio Portaccio</b>	<i>Optimal responder alle terapie disease modifying "platform", in una coorte Italiana di pazienti con sclerosi multipla ad esordio recidivante remittente</i>	<i>Terapia - fattori prognostici e modelli predittivi di risposte al trattamento</i>

# Italian Multiple Sclerosis & Related Disorders Register

The Italian Multiple Sclerosis & Related Disorders Register (IMS&RD) is one of the main Research Special Projects supported by the Italian MS Society (AISM) and its Foundation (FISM), which was launched with the **aim of creating a multicentric organized infrastructure to collect the data of all patients with MS followed in the various MS centers in Italy (a near population-level).**

## THE HISTORY OF THE IMS&RD

Since 2000, the Italian collection of MS clinical data started at different Italian MS centers in the framework of the Italian Multiple Sclerosis Database Network.

Since 2014, FISM in collaboration with the University of Bari and the Italian MS clinical centers, promoted and funded the creation of the Italian MS Register (IMSR).

Since 2021, for greater inclusiveness, the name of the Register has been changed to Italian Multiple Sclerosis & Related Disorder Register (IMS&RDR). A new module was included for the collection of information on rare forms of demyelinating diseases: demyelinating diseases and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder such as neuromyelitis optica (NMOSD) and pathologies associated with the presence of anti-MOG antibodies (MOGAD).

**177 Italian clinical centers** have joined the project and to date, the IMS&RDR collects the demographic and clinical data of **approximately 81,700 people in care by Italian clinical centers.**

The Register is therefore ready to become a true scientific research tool that can be useful for the development of epidemiological and clinical studies, as well as being a valid tool for health planning by promoting the equity of access to care by comparing the welfare practices of the different centers and to study / evaluate national and local welfare policies.

## HIGH-PRIORITY AREAS

The Scientific Committee of the IMS&RDR has identified two high-priority areas:

- **Public Health:** to set up a universal census of patients that is systematically and continuously updated, in order to obtain accurate estimates of prevalence and incidence of the disease at regional and national level in order to improve quality of care, health optimization, social and welfare information, access to healthcare treatments and services.
- **Research:** to gather useful information for the planning of research studies for specific projects. In particular, studies on epidemiology and prognosis, treatment optimization (effectiveness and safety), MS disease course, early and pre-clinical/subclinical disease stages (CIS and RIS).

## INFRASTRUCTURE ORGANIZATION

### GOVERNANCE

The governance of the IMS&RDR includes an **Executive Committee** (chaired by FISM and the University of Bari) with the administrative and organizational role and a **Scientific Committee** (includes clinicians, methodologists, representatives of MS centers, and of the Italian Neurological Society) which oversees the scientific initiatives, promotes specific strategic projects, and approves requests of access to centralized data for further research projects.

The current **Scientific Committee:**

#### **Maria Trojano**

*Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari*

#### **Mario Alberto Battaglia**

*Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova*

#### **Marco Capobianco**

*Centro Regionale di riferimento per la Sclerosi Multipla, Unità Neurologica, Ospedale Universitario San Luigi Orbassano, Torino*

#### **Maura Pugliatti**

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

#### **Monica Ulivelli**

*Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche e Neuroscienze, Università di Siena, Siena*

**Claudio Gasperini**

Dipartimento di Neuroscienze, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

**Paola Mosconi**

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano

**Roberto Bergamaschi**

Centro SM, IRCCS Fondazione Mondino, Pavia

**Maria Pia Amato**

Dipartimento di NEUROFARBA, Università di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

**Giancarlo Comi**

Università Vita-Salute, San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

**Francesco Patti**

Centro SM, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Policlinico Vittorio Emanuela, Università degli Studi di Catania, Catania

**OPERATIONAL STRUCTURES**

Two operational structures work for the IMS&RDR: the **Technical and Administrative Structure** (TAS) based at FISM in Genoa and the **Technical Methodological Structure** (TMS) based at Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano

**NETWORKS RELATED TO THE IMS&RDR****MS CLINICAL CENTERS NETWORK**

MS centers are recognized as the key component of MS care in Italy. There are approximately 240 MS centers of varying size, and they are often located within public hospital neurology departments. Currently about 74% of the Italian MS centers have joined the IMS&RDR.

**RESEARCH ASSISTANT NETWORK**

With the aim to increase the quality of data collection and data entry, a network of young research assistants (RA) has been trained ad hoc. Currently 18 Research Assistants are active in 14 Italian Regions (approximately following 100 centers) and are allocated to one or more centers according to their contribution to the project in terms of the number of patients recorded and the geographic distribution. The activities of the RAs include: supporting the start-up phase of the project at the MS centers, supporting the on-time implementation of the project at the MS centers and ensuring a standardized data collection and management.

**STAKEHOLDER ADVISORY BOARD(S)**

To meet the strategic priorities of the IMS&RDR, relevant stakeholders, including industries, are engaged with an advisory forum. Currently an Industry Advisory Board, including the main pharma companies with interest in MS, is active.

**DEDICATED SOFTWARE**

During the first years, the IMS&RDR used a client-server solution software (iMed<sup>®</sup> software), an offline computerized medical folder that needed a periodic upload by clinical centers. At the end of 2016, **a new web-based software** was developed. **From April 2021**, the IMS&RDR is running on **a new modular web-based software** in an exclusive way. Currently **the software release is 3.0**. The software access happens through the reserved area of the website of the project (<https://www.registroidalianosm.it/>).

**SKILLS OF THE NEW PLATFORM**

- **Patient-centered:** the patient is registered only once in the database through a tax code (unique personal identification code). This is a crucial point because the uniqueness of the registered SM subject produces a significant improvement in the pooling of the data in the central database. No double cases are now present in the database.
- **Practical:** data entry is possible through different devices (PC, mobile, tablet).
- **Secure:** the system respects the standards required by the European Union General Data Protection Regulation (GDPR) 2016/679 and each center enters the data through a personalized password.

- **Easily accessible:** an internet access is sufficient.
- **Standardized:** the database uses standardized coding.
- **Printable:** it is possible to print a report containing patient information.
- **Modular:** it is possible to add several modules.

## SOFTWARE STRUCTURE OF THE IMS&RDR

The IMS&RDR database collects a minimum data set of variables including crucial information that are useful to characterize the MS patient and other variables included in specific modules such as:

### Drugs

This section is dedicated to the patient's treatment history. This module includes the risk-management plan for all the Disease Modifying Treatments. Moreover, AEs and SAEs are codified using MedDRA and comorbidities are codified using ICD9.

### MRI

This section is dedicated to conventional magnetic resonance imaging (MRI) measures (Brain and SC T2 and T1 and Gd+T1 lesion numbers).

### Instrumental

This section collects information about laboratory tests (i.e. virological, immunological, thyroid function and other specific tests), liquor, evoked potentials, EEG, ECG.

### Covid-19

This section collects information related to the Covid-19 infection such as: diagnosis, severity, outcome and correlation with DMTs and vaccinations.

### NMOSD and MOGAD

This section is dedicated to rare forms of demyelinating diseases: demyelinating diseases and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder such as Neuromyelitis Optica (NMOSD) and pathologies associated with the presence of anti-MOG antibodies (MOGAD).

### Pregnancy

This section collects information regarding pregnancy, maternal and foetal outcomes of MS patients and their children.

### Pediatric Onset MS

This section collects information on pediatric-onset MS. This module includes information such as: environmental risk factors, vaccinations, cognitive functioning over time and specific MRI features.

## DATA MONITORING

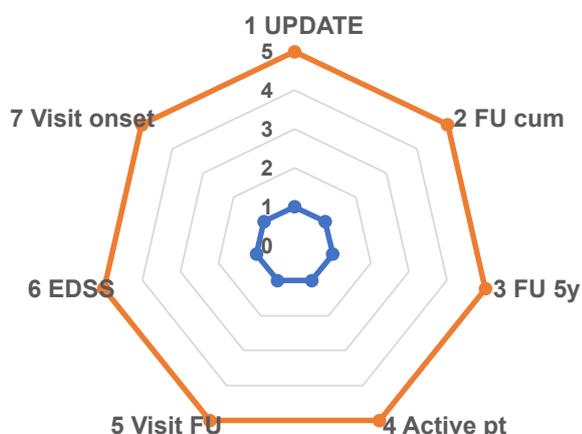
Data are centrally monitored in order to guarantee a high quality of the information collected. Several tools of quality control have been implemented in order to increase the quality and generalizability of the data collected. Each center periodically receives a report on all the data collected and a tailored report with queries on the missing data or inconsistencies among the variables inserted. Quality controls regard:

- **dates:** presence/absence, completeness, anomalies and consistency among all the data collected in the dataset
- **completeness:** overall evaluation of the completeness level of the variables included
- **accuracy:** proportion of variables with value corresponding to their range
- **consistency:** congruency with other variables

Every 2 months, research assistants are updated on the progress of the centers they are in charge of and share the information with the responsible of the clinical center. Monthly, each center receives a communication with updates and clarification regarding data entry and procedures pertaining to the project.

Moreover, a set of 7 performance indicators has been identified and adopted with the aim to improve the quality, completeness of the survey, timeliness, generalization, and representativeness of the collected data. For each examined indicator or domain, each participating center was awarded with a score of five for the highest performance, while lower scores of 4 to 1 were attributed for progressively lower performance. Every 6 months, each participating center receives a report where data and performance indicators of its own center are benchmarked with the whole sample: in this way, each center can assess the most critical performances and the level of improvement with time.

Here the 7 performance indicators and their graphical representation (radar graph):



1. **UP DATE:** update data
2. **FU cum:** cumulative follow-up as person/year
3. **FU 5y:** % of patients with follow-up longer than 5 years
4. **Active pz:** At least 1 visit in the last 2 years
5. **Visit FU:** At least 1 visit every 6 months/FU
6. **EDSS:** At least 1 EDSS evaluation every 6 months/FU
7. **Visit onset:** At least 1 visit within 1 year from onset

## THE EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY) INITIATIVE FOR PATIENT REGISTRIES

Real-world data are vital as they offer long-term data collection and allow to evaluate patient's treatment history throughout the disease course. The use of disease registries may provide a better understanding of the effects of comorbidity on effectiveness and safety of disease modifying treatments. EMA is interested in real-world data regarding the post-marketing drug safety assessment (i.e., Post-Authorization Safety Study—PASS). The international data-sharing initiative “Big MS Data Group network” that include the IMS&RDR, has been recognized as a high quality initiative by EMA, able to provide data for PASS.

Currently, three PASS based on the IMS&RDR are ongoing:

1. An observational study utilizing data from the US Tysabri TOUCH programme and select EU MS Registries to estimate **the risk of progressive multifocal leukoencephalopathy** and other serious opportunistic infections among patients who were exposed to an MS disease modifying treatment prior to treatment with **Tysabri (BIOGEN)**
2. Long-term surveillance of **Ocrelizumab** (MANUSCRIPT study) treated patients with multiple sclerosis (**ROCHE**)
3. Long-term surveillance (CLARION study) of **oral Cladribine** in patients with highly active relapsing multiple sclerosis (**MERCK**)

## RESEARCH PROJECTS BASED ON THE IMS&RD DATA

Currently 46 projects approved, 24 completed and 22 ongoing.

The main priority areas of the research projects are:

- **Descriptive Epidemiology** (prevalence, incidence and mortality)
- **Analytical Epidemiology** (risk factors, comorbidity and prognostic factors)
- **MS and RD courses** (benign, RIS, CIS, progressive form, pediatric onset, late onset, aggressive form, NMOSD and MOGAD)
- **Therapy** (prognostic factors and predictive models of treatment response, treatment adherence, short and long-term treatment effectiveness, safety, comparative effectiveness/safety between treatments, treatment algorithms and switches)

Since 2018 to 2022, over 25 peer-reviewed publications were published on international journals.

Here are reported the title of 18 ongoing projects.

<b>Principal Investigator</b>	<b>Title of the project</b>	<b>Priority areas</b>
<b>Giuseppe Fenu</b>	<i>Changes of clinical and demographic characteristics in patients with MS diagnosis during the various decades between 1983 and 2016</i>	<i>Descriptive Epidemiology - prevalence</i>
<b>Monica Ulivelli</b>	<i>Immunisation status against major communicable diseases preventable with vaccines, and safety of vaccines, in a cohort of multiple sclerosis patients. An Italian multicenter study</i>	<i>Descriptive Epidemiology - prevalence</i>
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<i>Air pollution as a risk factor of multiple sclerosis. An ecological study in the Italian population (The AIRMUS study)</i>	<i>Analytical Epidemiology - risk factors</i>
<b>Giovanni Ristori</b>	<i>Secondary prevention in multiple sclerosis: "Bacille Calmette-Guérin" (BCG) vaccine in people with radiologically isolated syndrome (RIS)</i>	<i>Analytical Epidemiology - risk factors</i>
<b>Jessica Frau</b>	<i>Evaluation of baseline prognostic factors in a large Italian cohort of patients with multiple sclerosis</i>	<i>Analytical Epidemiology - prognostic factors</i>
<b>Maurizio Leone</b>	<i>Integrating genetic and phenotypic data from the PROGEMUS data-base and the Italian Multiple Sclerosis registry</i>	<i>Analytical Epidemiology - prognostic factors</i>
<b>Marco Salvetti</b>	<i>Use of Machine Learning techniques in predicting the course of relapsing-remitting Multiple Sclerosis in individual patients</i>	<i>Analytical Epidemiology - prognostic factors</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Clinical and neuroradiological findings in patients with late-onset multiple sclerosis (LOMS)</i>	<i>MS and RD courses - late onset</i>
<b>Maria Pia Amato</b>	<i>Evaluating Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments in a Real-Life Cohort</i>	<i>Therapy - prognostic factors and predictive models of treatment response</i>
<b>Massimo Filippi</b>	<i>Predictors of response to cladribine in multiple sclerosis patients</i>	<i>Therapy - prognostic factors and predictive models of treatment response</i>
<b>Roberto Bergamaschi</b>	<i>New generation of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulators in clinical practice: a real-world study from the Italian MS Registry</i>	<i>Therapy - short and long-term treatment effectiveness</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Evaluating the efficacy of Ocrelizumab in Primary Progressive Multiple Sclerosis: a Multicenter Retrospective Study (OPPORTUNITY)</i>	<i>Therapy - short and long-term treatment effectiveness</i>
<b>Emanuele D'Amico</b>	<i>Stop or not the disease-modifying therapies in secondary progressive multiple sclerosis: a comparison study of disability accrual trajectory</i>	<i>Therapy - safety</i>
<b>Tomas Kalincik</b>	<i>Timing and comparative effectiveness of high-efficacy disease-modifying therapies in childhood-onset multiple sclerosis</i>	<i>Therapy - comparative effectiveness/ safety between treatments</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Evaluating the effectiveness of Rituximab in relapsing Multiple Sclerosis patients previously treated with highly-Active Disease modifying therapies (RENEGADE).</i>	<i>Therapy - short and long-term treatment effectiveness</i>
<b>Francesco Patti</b>	<i>Evaluating the clinical and MRI characteristics of Secondary Progressive Multiple Sclerosis; a registry-based/multicentric cohort study (ASPERA).</i>	<i>Analytical Epidemiology - risk factors</i>
<b>Paola Cavalla</b>	<i>SARS-CoV-2 pandemic as a model to assess the relationship between intercurrent viral infections and disease activity in Multiple Sclerosis: a propensity score matched case-control study</i>	<i>Analytical Epidemiology - risk factors</i>
<b>Emilio Portaccio</b>	<i>Optimal responders to platform disease modifying therapies in an Italian cohort of relapsing-onset multiple sclerosis patients</i>	<i>Therapy - prognostic factors and predictive models of treatment response</i>

## Predizione precoce di evoluzione sfavorevole in pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS). Studio RECIS (stima del rischio in CIS)



### Roberto Bergamaschi

U.O. Sclerosi Multipla, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale "C. Mondino", Pavia, Italia

#### COLLABORATORI/ COLLABORATORS

**Giulia Mallucci, Elena Colombo, Eleonora Rigoni**

#### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Cristina Montomoli, Ottavia Ferraro**, *Unità di Biostatistica e Epidemiologia Clinica, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina sperimentale e forense. Università degli studi di Pavia, Pavia, Italia*

**Maria Trojano, Pietro Iaffaldano**, *Dipartimento di Neurologia, Università degli studi di Bari, Bari, Italia*

**Maria Pia Amato**, *Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi; IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia*

**Lorenzo Razzolini, Elio Prestipino**, *Dipartimento NEUROFARBA, Sezione Neuroscienze, Università degli studi di Firenze, Firenze, Italia*

**Mauro Zaffaroni, Lorenzo Saraceno**, *Centro Sclerosi Multipla, ASST della Valle Olona, Ospedale di Gallarate, Gallarate (VA), Italia*

### PREMESSE E OBIETTIVI

L'identificazione di fattori prognostici della sclerosi multipla (SM) al suo esordio sarebbe utile nella pratica clinica per supportare scelte terapeutiche precoci e personalizzate.

Lo studio si è proposto di definire un modello prognostico ottimale in grado di fornire per i pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS) un punteggio di rischio individuale (RECIS), per la previsione precoce della perdita della condizione di NEDA (nessuna evidenza di attività di malattia) entro 12 mesi dall'esordio della malattia, attraverso l'analisi di un ampio set di dati clinico-demografici (sesso, età, tipo di coinvolgimento neurologico, EDSS) e strumentali-laboratoristici (numero e sede delle lesioni cerebrali alla RMN, presenza di bande oligoclonali nel liquido cerebrospinale - BO, potenziali evocati visivi e somatosensitivi - PEV e PES) raccolti all'esordio della malattia.

### RISULTATI

Per identificare il miglior modello prognostico, abbiamo analizzato i dati retrospettivi di 221 pazienti CIS provenienti da 4 centri SM Italiani: Gallarate e Pavia (Nord Italia), Firenze (Centro Italia), Bari (Sud Italia).

Dopo 12 mesi dall'esordio della CSI, il 38% dei pazienti aveva presentato EDA. Le variabili sono state incluse in quattro diversi modelli di regressione multivariata con 1000 repliche bootstrap: 1) una regressione logistica 'stepwise' 2) una regressione Lasso con un approccio 'cross validation' 3) una regressione Lasso con approccio adattivo e 4) una regressione Lasso con un approccio 'plug-in'. Secondo il miglior modello prognostico, il rischio di EDA a 12 mesi era più alto nei pazienti più giovani e in quei pazienti che all'esordio della malattia avevano lesioni sottotensoriali alla RMN, BO e PES degli arti inferiori anormali.

È stato prodotto uno score sintetico (RECIS) composto dalle variabili selezionate dal modello migliore ed è stato stimato il cut-off ottimale (0,65) per prevedere la probabilità di passare dalla condizione di NEDA a EDA entro un anno. Lo score RECIS ha mostrato una buona specificità (72%) come strumento per predire l'evoluzione delle CIS: punteggi RECIS più elevati erano collegati a un aumento del rischio di perdere NEDA entro 12 mesi. Ad esempio, secondo il RECIS, un paziente CIS di 30 anni con BO, PES degli arti inferiori anormali e lesioni sottotensoriali alla RMN, avrà l'85% di probabilità di raggiungere lo stato EDA entro 12 mesi.

## CONCLUSIONI

Il RECIS è uno strumento semplice, che può essere utilizzato all'esordio della SM per predire la sua evoluzione entro 12

mesi a livello di singolo paziente. Questo strumento potrebbe essere utile nel sostenere decisioni terapeutiche personalizzate nel contesto della pratica clinica.

# Early prediction of unfavorable evolution of clinically isolated syndrome (CIS) patients. The RECIS (risk estimate for CIS) study

## INTRODUCTION AND AIMS

The identification of early indicators of multiple sclerosis (MS) prognosis is useful in clinical practice to support early and personalized therapeutic choices.

The aim of the study was to define a prognostic model, which gives in clinically isolated syndrome (CIS) patients an individual risk score (risk estimate for CIS, RECIS), for the early forecast of losing NEDA status (no evidence of disease activity) within 12 months from disease onset, through the analysis of a large set of clinical-demographics (sex, age, type of neurological involvement, EDSS) and instrumental-laboratory (number and site of brain MRI lesions, cerebro-spinal fluid oligoclonal bands - OB, visual and somatosensory evoked potentials - VEPs and SEPs) variables collected at disease onset.

## RESULTS

To identify the best prognostic model, we analyzed retrospective data of 221 CIS patients from 4 Italian MS Centres: Gallarate and Pavia (Northern Italy), Florence (Central Italy), Bari (Southern Italy).

After 12 months from CIS onset, 38% of patients displayed EDA. The variables were included in four different multivariable regression models with 1000 bootstrap replications:

1) a stepwise logistic regression, 2) a Lasso regression with cross-validation approach, 3) a Lasso regression with adaptive approach, and 4) a Lasso regression with plugin approach. According to the best prognostic model, the risk of EDA at 12 months was higher in younger patients and in those patients that at disease onset had MRI infratentorial lesion(s), OBs and abnormal SEPs in lower limbs.

A final score (RECIS score) composed by the variables selected from the best model was reported and the optimal cut-off (0.65) to predict the probability to change the status from NEDA to EDA within one year was estimated. The RECIS score showed good specificity (72%) as a tool for predicting the evolution of CIS: higher RECIS scores were linked to an increased risk of losing NEDA within 12 months. For example, according to RECIS score, a 30-year-old patient with oligoclonal bands, abnormal lower limb SEP and infratentorial lesions at MRI at the onset of the CIS will have 85% of probability to reach EDA status within 12 months.

## CONCLUSIONS

RECIS score is a simple tool, which can be used at MS onset to predict its evolution within 12 months at a single patient level. This instrument could promote tailored therapeutic decisions in clinical practice setting.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Mallucci G, Trivelli L, Colombo E, Trojano M, Amato MP, Zaffaroni M, Iaffaldano P, Razzolini L, Prestipino E, Saraceno L, Montomoli C, Bergamaschi R. The RECIS (Risk Estimate in CIS) study: a novel model to early predict clinically isolated syndrome evolution. *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL* 2019. 35th Congress of the European-Committee-for-Treatment-and-Research-in-Multiple-Sclerosis (ECTRIMS), Stockholm, SWEDEN Research project of the Italian Multiple Sclerosis Register

# Definizione dei predittori precoci clinici e di risonanza magnetica di risposta al trattamento nei pazienti con sclerosi multipla pediatrica



## Maria Pia Amato

Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi; IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Ermelinda De Meo**, University College of London, London, UK

**Emilio Portaccio**, Dipartimento NEUROFARBA, Università di Firenze, Firenze, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) pediatrica, con esordio della malattia prima dei 18 anni di età, rappresenta il 3-10% di tutti i casi di SM.<sup>1</sup> Nell'ultimo decennio, la SM ad esordio pediatrico è stata sempre più diagnostica, rendendo quindi necessario identificare le caratteristiche di questa malattia legate all'insorgenza della stessa durante infanzia e adolescenza.

Più del 98% dei bambini e degli adolescenti con diagnosi di SM segue un decorso recidivante-remittente (RR).<sup>2</sup>

La SM ad esordio pediatrico è caratterizzata da elevata attività di malattia, sia dal punto di vista clinico che neuroradiologico.<sup>3</sup> All'interno della stessa popolazione pediatrica affetta da SM, sono state osservate differenze in termini di caratteristiche cliniche, neuroradiologiche ed immunologiche tra i pazienti pediatrici con esordio precoce (cioè, per convenzione, prima degli 11 anni di età) e tardivo. Considerando questi punti, è apparso necessario in primo luogo caratterizzare ulteriormente questa popolazione analizzando i dati provenienti da un'ampia coorte di pazienti con SM ad esordio pediatrico raccolti nel Registro Italiano Sclerosi Multipla.

In dettaglio, abbiamo mirato a descrivere e confrontare la storia naturale della SM pediatrica ad esordio precoce e tardivo e ad identificare le caratteristiche cliniche e di risonanza magnetica all'esordio della malattia in grado di predire un decorso più grave della malattia. Quindi, abbiamo mirato a identificare i predittori clinici e neuroradiologici della risposta al trattamento a tre anni, al fine di ottimizzare le strategie terapeutiche ed ottenere un migliore rapporto rischio-beneficio per l'utilizzo dei nuovi farmaci. Abbiamo infine combinato le caratteristiche cliniche e

neuroradiologiche riportate ad un anno dall'inizio del trattamento per identificare un punteggio di risposta al trattamento specifico per i pazienti pediatrici.

## RISULTATI

Per la prima parte del nostro progetto, di 3332 pazienti con SM ad esordio pediatrico inclusi nel Registro Italiano SM, è stata selezionata una coorte di 1993 pazienti con SM ad esordio pediatrico.<sup>5</sup> Dei 1993 casi di SM pediatrica selezionati per l'analisi finale, 172 (9%) sono stati classificati come SM pediatrica ad esordio precoce.

Una percentuale maggiore di maschi, un coinvolgimento isolato del tronco-encefalo ed un intervallo di tempo più lungo tra il primo e il secondo episodio clinico sono stati osservati nei pazienti pediatrici a esordio precoce rispetto a quello tardivo. È emerso che rispetto ai pazienti pediatrici ad esordio tardivo, i pazienti ad esordio precoce impiegano più tempo dall'esordio della malattia per evolvere nel fenotipo secondariamente progressivo e per raggiungere tre distinte pietre miliari di disabilità (punteggi Expanded Disability Status Scale di 3, 4 e 6). Il recupero dal primo evento demielinizzante, il tempo dall'esordio di malattia alla prima recidiva, il tasso annualizzato di recidive durante i primi 3 anni di malattia e l'esposizione a trattamenti modificanti il decorso di malattia sono stati individuati quali predittori indipendenti della disabilità a lungo termine nei pazienti pediatrici ad esordio precoce. Nei pazienti pediatrici ad esordio tardivo, neurite ottica isolata, sintomi multifocali o decorso progressivo sin dall'esordio della malattia sono risultati quali ulteriori predittori di disabilità a lungo termine.

Per quanto riguarda il secondo obiettivo del nostro pro-

getto, abbiamo identificato la presenza di almeno tre nuove lesioni T2 o Gd+ rilevate alla risonanza magnetica ad un anno dall'inizio del trattamento e il verificarsi di almeno due recidive durante il primo anno di trattamento come predittori indipendenti di fallimento terapeutico a 3 anni. In base a questi risultati, abbiamo raggruppato i livelli di rischio in tre classi:

- Gruppo 0: <2 recidive durante il primo anno di trattamento e <3 nuove lesioni T2 o Gd+ alla risonanza magnetica a 1 anno;
- Gruppo 1: ≥2 recidive durante il primo anno di trattamento o : ≥2 nuove lesioni T2 o Gd+ alla risonanza magnetica a 1 anno;
- Gruppo 2: ≥2 recidive durante il primo anno di trattamento e ≥3 nuove lesioni T2 o Gd+ alla risonanza magnetica a 1 anno.

In base a queste caratteristiche, il 79% dei pazienti pediatrici con SM è risultato nel gruppo 0, il 19% nel gruppo 1 e il 2% nel gruppo 2. Dato il piccolo numero di pazienti nella categoria di rischio più alto, il gruppo 1 e 2 sono stati considerati insieme, per definire un gruppo a più alto rischio di fallimento terapeutico a tre anni.

L'appartenenza alla categoria ad alto rischio confrontata a quella basso rischio ha mostrato un valore predittivo positivo del 75%, un valore predittivo negativo del 73%, una sensibilità del 44%, una specificità del 91% ed un'accuratezza globale del 68% nell'identificare i pazienti che

vanno incontro a fallimento terapeutico dopo 3 anni. Inoltre, i pazienti pediatrici con SM nella categoria a basso rischio hanno mostrato una probabilità di peggioramento dell'EDSS 3 anni dopo il primo anno di terapia dell'11% mentre i pazienti pediatrici con SM nella categoria ad alto rischio del 26%.

## CONCLUSIONI

Confrontando la storia naturale della SM pediatrica ad esordio precoce con quella ad esordio tardivo, in un'ampia coorte di pazienti, il nostro studio ha identificato diverse caratteristiche specifiche della SM pediatrica a esordio precoce.

Il nostro studio sottolinea inoltre l'importanza dell'introdurre un trattamento atto a modificare il decorso di malattia quanto più precocemente possibile ed individua informazioni prognostiche di rilievo al fine di migliorare la gestione clinica dei pazienti pediatrici con SM.

La combinazione di recidive cliniche con una sostanziale attività neuroradiologica di malattia è apparsa come il miglior predittore di fallimento terapeutico a breve termine e di progressione di malattia a breve-medio termine nei pazienti pediatrici con SM. L'adozione di questo punteggio specifico per SM pediatrico nella pratica clinica potrebbe aiutare il medico nella valutazione del fallimento terapeutico e nell'ottimizzazione delle strategie di trattamento.

# Assessing early clinical and MRI predictors of treatment response in pediatric multiple sclerosis patients

## BACKGROUND AND AIMS

Pediatric multiple sclerosis (MS), with disease onset before 18 years of age, represents 3-10% of all MS cases.<sup>1</sup> During the last decade, pediatric MS has been increasingly recognized, thus making necessary to identify specific features related to disease onset during childhood and adolescence.

More than 98% of children and adolescents diagnosed with MS follows a relapsing-remitting (RR) course.<sup>2</sup> It is characterized by both clinical and MRI evidence of highly active inflammation and remyelination,<sup>3</sup> with frequent but highly recoverable relapses early in the disease.<sup>4</sup> Among pediatric MS population significant differences in clinical, MRI, and immunological features were observed between early (i.e., by convention, before age 11 years) and late onset pediatric MS patients.

Considering these points, it appeared necessary as first to further characterize this population by analyzing data from a large real-life cohort of pediatric onset MS patients collected in the Italian MS Registry.

In details, we aimed to describe and the natural history of early and late onset pediatric MS and to identify clinical and MRI features at disease onset able to predict a more severe disease course. Then, we aimed to identify early clinical and MRI predictors of three-years treatment response in order to optimize treatment strategies to a better risk-benefit ratio from new highly active drugs. Moreover, we aimed to combine clinical and MRI features recorded over the first year of treatment to identify a score of treatment response specific for pediatric patients.

## RESULTS

For the first part of our project, from 3332 pediatric onset MS patients, a cohort of 1993 pediatric onset MS patients was selected from the Italian MS Register.<sup>5</sup> Of 1993 pediatric MS cases selected for the final analysis, 172 (9%) were classified as early onset pediatric MS.

A greater proportion of males, isolated brainstem involvement, and longer time interval between first and second clinical episode was observed in early vs late onset pediatric

tric patients. Compared to late onset, early onset pediatric patients took longer time from disease onset to convert to secondary progressive phenotype and to reach three distinct disability milestones (Expanded Disability Status Scale scores of 3, 4, and 6). Recovery from first demyelinating event, time to first relapse, annualized relapse rate during the first 3 years of disease and disease-modifying treatments exposure were independent predictors for long-term disability in early onset pediatric patients. In late onset pediatric patients, isolated optic neuritis, multifocal symptoms or progressive course at disease onset were additional predictors for long-term disability.

To the second aim of our project, we identified the presence of at least three new T2 or Gd+ lesions detected on 1-year MRI scan and the occurrence of at least 2 relapses during the first year of treatment as independent predictors of treatment failure after 3 years. According to these findings, we grouped risk levels into three classes:

- Group 0: <2 relapses during the first year of treatment and <3 new T2 or Gd+ lesions at 1-year MRI scan;
- Group 1: ≥2 relapses during the first year of treatment or ≥3 new T2 or Gd+ lesions at 1-year MRI scan;
- Group 2: ≥2 relapses during the first year of treatment and ≥3 new T2 or Gd+ lesions at 1-year MRI scan.

According to this features the 79 % of pediatric MS patients resulted in group 0, 19% in group 1 and 2% in

group 2. Given the small number of patients in the highest risk category, group 1 and 2 were also considered together, to define the highest risk group.

High risk vs low risk category had a positive predictive value of 75% and a negative predictive value of 73%, a sensitivity of 44%, a specificity of 91%, and a global accuracy of 68% for identifying patients developing treatment failure over 3 years. Furthermore, pediatric MS patients in low risk category showed a probability of EDSS worsening over 3 years following the first year of therapy of 11% while pediatric MS patients in high risk category of 26%.

## CONCLUSIONS

Comparing the natural history of early and late onset pediatric MS in a large, real-life cohort of patients, our study identified several specific features of early onset pediatric MS. Moreover, this study also points to the critical importance of early treatment in this population, and it adds relevant prognostic information to improve the clinical management of pediatric MS patients.

The combination of clinical relapses with substantial MRI activity appeared as the best predictor of short-term treatment failure and disease progression in pediatric MS patients. The adoption of this simple and pediatric MS-specific score in the clinical practice could help clinician in evaluating treatment failure and in optimizing treatment strategies.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- De Meo E, Filippi M, Trojano M, Comi G, Patti F, Brescia Morra V, Salemi G, Onofrj M, Lus G, Cocco E, Fonderico M, Torri Clerici V, Maniscalco GT, Valentino P, Bertolotto A, Lugaresi A, Bergamaschi R, Rovaris M, Sola P, Tedeschi G, Pesci I, Aguglia U, Cavalla P, Maimone D, Granella F, Vianello M, Simone M, Portaccio E, Amato MP. Comparing Natural History of Early and Late Onset Pediatric Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2022 Apr;91(4):483-495. doi: 10.1002/ana.26322. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35150168
- De Meo E, Fonderico M, Filippi M, Patti F, Brescia Morra V, Salemi G, Lus G, Onofrj M, Cocco E, Maniscalco G, Bertolotto A, Confalonieri P, Bergamaschi R, Lugaresi A, Valentino P, Sola P, Cavalla P, Maimone D, Granella F, Pesci I, Rovaris M, Simone M, Trojano M, Amato MP. Natural history of multiple sclerosis with childhood and adolescence onset. *Multiple Sclerosis Journal*. 2021;27(2\_suppl):134-740. doi:10.1177/13524585211044667 (ECTRIMS 2021)
- Ermelinda De Meo, Massimo Filippi, Vincenzo Brescia Morra, Francesco Patti, Giorgia Teresa Maniscalco, Valentina Torri Clerici, Giuseppe Salemi, Marco Onofrj, Giacomo Lus, Marta Simone, Maria Trojano, Maria Pia Amato. Assessing treatment response in pediatric multiple sclerosis patients (P16-4.003), *Neurology* May 2022, 98 (18 Supplement) 3251 (AAN 2022)

### Abstracts

- De Meo E, Fonderico M, Filippi M, Patti F, Brescia Morra V, Salemi G, Lus G, Onofrj M, Cocco E, Maniscalco G, Bertolotto A, Confalonieri P, Bergamaschi R, Lugaresi A, Valentino P, Sola P, Cavalla P, Maimone D, Granella F, Pesci I, Rovaris M, Simone M, Trojano M, Amato MP. Long term disability progression in early and late onset pediatric multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2021; 28 (Suppl 1): 464 (EAN Congress 2021)

# PROfiling del rischio di eventi avversi gravi durante il sequenziamento delle terapie nei pazienti con sclerosi multipla: analisi osservazionale di coorte basata sul Registro Italiano Sclerosi Multipla



## Damiano Paolicelli

*Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari, Italia*

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Giuseppe Lucisano, Alessia Manni, Rossana Sgobio, Antonio Iaffaldano, Pietro Iaffaldano, Maria Trojano, on behalf of the Italian MS Register**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le terapie modificanti la malattia (DMT) per la sclerosi multipla (SM) modulano o inibiscono i processi autoimmunitari alla base della malattia. Nella SM Recidivante, il profilo rischio-beneficio dei DMT varia notevolmente tra i trattamenti, spaziando da terapie con un effetto modesto che si coniuga ad un eccellente profilo di sicurezza, a opzioni farmacologiche altamente efficaci ma con un maggior rischio di eventi avversi (AE), talora anche gravi. Fra i maggiormente riportati: cardiotoxicità e leucemia acuta dopo trattamento a lungo termine con mitoxantrone; leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) associata a natalizumab; aritmie da fingolimod, infezioni da virus varicella-zoster che si verificano con anticorpi monoclonali e agenti immunosoppressori; malattie autoimmuni correlate all'alemtuzumab, tumori maligni e infezioni opportunistiche indotte da farmaci di immunoricostruzione e terapie con somministrazione pulsata. Due diversi approcci terapeutici sono ampiamente utilizzati per il trattamento della SM: l'escalation e la terapia di induzione. La terapia di escalation consiste nell'avvio precoce di DMT di prima linea, per passare, qualora questi risultino parzialmente o completamente inefficaci, a farmaci di seconda linea come gli agenti immunosoppressori. L'approccio di induzione supporta invece l'uso precoce di agenti immunosoppressori seguiti da trattamenti di mantenimento a lungo termine, generalmente agenti immunomodulatori. Idealmente, i pazienti con risposta ottimale al trattamento dovrebbero essere privi di attività di malattia e senza evidenza di eventi avversi, tuttavia tali obiettivi sono

difficili da valutare sul lungo termine, in una patologia cronica come la SM, data la durata relativamente breve degli studi clinici. Un gran numero di pazienti però, ha necessità di un cambio terapeutico durante il decorso della malattia. Il sequenziamento delle differenti DMT dovrebbe essere progettato nel singolo paziente in modo tale da massimizzare il controllo della malattia e minimizzare i rischi, in base al meccanismo d'azione, alle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche di ciascuna terapia. La reversibilità degli effetti di ciascun DMT sul sistema immunitario dovrebbe essere inoltre un altro fattore chiave per la selezione della sequenza DMT. I rischi associati al trattamento della SM sono influenzati da fattori correlati al farmaco (modalità di azione, effetti on/off-target, terapia cronica rispetto a terapia pulsata), e fattori correlati al paziente (trattamento sequenziale, comorbidità, età, predisposizione genetica, stile di vita/fattori ambientali), che devono essere considerati in un approccio globale di valutazione e monitoraggio del rischio.

La crescente complessità delle terapie per la SM, in particolare per quanto riguarda il sequenziamento del trattamento con la possibilità di effetti sul sistema immunitario che vanno a sommarsi di farmaco in farmaco, aumenta la necessità di una raccolta standardizzata di dati di farmacovigilanza/sicurezza nei registri dei pazienti specifici per malattia. Tali database forniscono una piattaforma per l'analisi sistematica e indipendente dei dati sulla sicurezza dopo l'approvazione del farmaco e facilitano l'applicazione clinica degli stessi. Pertanto abbiamo mirato a valutare, il rischio di eventi avversi gravi (SAE), in relazione a diffe-

renti schemi terapeutici di DMT, in un'ampia coorte di pazienti con SM. Sono stati inclusi nel nostro studio pazienti con SM (pwMS) recidivanti (R) e secondari progressivi (SP) di età  $\geq 18$  anni, trattati con almeno un DMT, i cui dati erano inseriti nel Registro italiano della Sclerosi Multipla.

## RISULTATI

Abbiamo classificato i DMT in tre diversi gruppi: farmaci di 1<sup>a</sup> linea (Interferoni/Glatiramer Acetato/Teriflunomide/Dimetilfumarato/Azatioprina); 2<sup>a</sup> Lunga (2<sup>a</sup> LineaL) (terapia continuativa: Fingolimod/Ocrelizumab/ Rituximab/Natalizumab/ Siponimod); 2<sup>a</sup> linea Breve (2<sup>a</sup> LineS) (terapia pulsata: Alemtuzumab/ Mitoxantrone/ Cladribina/ Ciclofosfamide/ Metotrexato); questi, combinandosi, andavano a formare nove diverse sequenze terapeutiche. I SAE valutati sono stati: infezioni, linfopenia di grado III-IV e neoplasie, secondo la classificazione MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) disponibile sull'applicazione Web del Registro.

I dati sono stati estratti nel gennaio 2022. Le caratteristiche basali dei pazienti (numero, percentuale di pazienti di sesso maschile, età ed EDSS al primo DMT, tempo dall'inizio al primo inizio del trattamento) sono state descritte come mediana con un range interquartile o percentuale, a seconda dei casi. I tassi di SAE sono rappresentati come eventi ogni 1000 pazienti. Quando i pazienti passavano da un farmaco all'altro, l'incidenza di eventi avversi gravi veniva valutata per ogni periodo di terapia con il singolo farmaco.

Partendo da un campione di 50.039 soggetti, abbiamo selezionato, attraverso i criteri di inclusione precedente-

mente esposti, 22.237 pazienti. L'età al primo DMT variava, tra i diversi gruppi, da 32,1 (nei pazienti che passavano dalla 1<sup>a</sup> Linea alla 2<sup>a</sup> LineaS) a 42,9 anni (pazienti trattati solo con la 2<sup>a</sup> LineaS), mentre la percentuale di pazienti di sesso maschile da 27,6 % (coloro che passavano dalla 2<sup>a</sup> LineaL alla 1<sup>a</sup> Linea) a 36,7% (2<sup>a</sup> linea). Il tempo dall'insorgenza della SM all'avvio del primo trattamento era compreso tra 12,8 (nei pazienti che passano dalla 2<sup>a</sup> linea L alla 2<sup>a</sup> linea S) e 62,0 mesi (2<sup>a</sup> linea S). L'EDSS alla prima prescrizione di DMT era inferiore nei pazienti che iniziavano la 1<sup>a</sup> linea ed in quelli che passavano dalla 1<sup>a</sup> linea alla 2<sup>a</sup> lineaL (2.0). L'incidenza degli eventi avversi valutati variava tra gli schemi terapeutici considerati. Le infezioni erano più frequenti nei pazienti trattati in 2<sup>a</sup> linea rispetto a quelli in 1<sup>a</sup> linea (6.32 vs 46.56). Anche le neoplasie sono risultate più frequenti in 2<sup>a</sup> Linea che in 1<sup>a</sup> Linea (9.57 vs 2.50). Nei pazienti che passavano dalla 1<sup>a</sup> alla 2<sup>a</sup> linea, l'incidenza di SAE era più alta nel periodo della 2<sup>a</sup> linea. Sorprendentemente, la linfopenia è stata segnalata più frequentemente nei pazienti trattati con 1<sup>a</sup> linea rispetto a quelli in 2<sup>a</sup> linea, dati probabilmente influenzati dalla sotto-segnalazione dei casi su registro.

## CONCLUSIONI

Questi risultati preliminari sono interessanti per ulteriori analisi.

Sulla base di questa analisi esplorativa, sarà necessaria un'attenta valutazione dei diversi SAE durante il percorso terapeutico del paziente per confrontare le diverse sequenze di farmaci utilizzando modelli complessi più appropriati.

# PROfiling the risk of Severe Adverse Events during sequencing therapies in patients with multiple sclerosis: an observational cohort analysis based on Italian Multiple Sclerosis Registry

## INTRODUCTION AND AIMS

Disease-modifying therapies (DMTs) for multiple sclerosis (MS) modulate or suppress the autoimmune process that underlies the disease.

In RMS, the risk-benefit profile of the DMTs vary greatly across treatments, ranging from modest effect and excellent safety to drug options that are highly effective but with increased risk of Adverse Events (AEs), which may be serious in reported cases. These include but are not limited to: cardiotoxicity and acute leukaemia after long-term treatment with mitoxantrone; natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy (PML); arrhythmias with fingolimod, varicella-zoster virus infections

occurring with monoclonal antibodies and immunosuppressant agents; autoimmune diseases alemtuzumab related, malignancies and opportunistic infections induced by immune reconstitution drugs and target therapies with pulsed administration. Two different therapeutic approaches are widely used for the treatment of MS: escalation and induction therapy. Escalation therapy consists of early start with first line DMTs: if first line DMTs are ineffective or partially effective, the on-going therapy is switched to second line drugs as the immunosuppressant agents. Induction therapy supports the early use of immunosuppressant agents followed by long-term maintenance treatments, generally with the use of immunomodulatory agents.

Ideally, “optimal” treatment responders should be the patients free from disease activity without evidence of AEs, goals that are difficult to assess in the long-term studies given the relatively short duration of clinical trials for a lifelong condition such as MS and however most patients require a change in therapy during the course of the disease. Sequencing of DMTs for individual patients should be designed in such a way to maximize disease control and minimize risk based on the mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of each therapy. The reversibility of immune system effects should be a key consideration for DMT sequence selection. MS treatment associated risks are influenced by (I) drug-related factors (mode of action, on-/off-target effects, chronic versus pulsed therapy) (II) patient-related factors (sequential treatment, comorbidities, age, genetic predisposition, lifestyle/environments factors), which have to be considered in a comprehensive risk assessment and monitoring approach.

The increasing complexity of MS therapies, especially with regard to treatment sequencing and potential additive immune compromise, heightens the need for standardized pharmacovigilance/safety data collection in disease-specific patient registries. Such databases provide a platform for systematic and independent analysis of safety data after drug approval; and facilitate the provision of these data to the community.

Therefore, we aimed to assess, during different therapeutic schemes of DMTs for a large cohort of Italian MS patients, the risk of Severe Adverse Events (SAEs).

## RESULTS

We included Relapsing (R) and Secondary Progressive (SP) patients with MS (pwMS), aged  $\geq 18$  years, treated with at least one DMT, included in the Italian MS Registry. We classified DMTs into three different groups: 1st Line (Interferons/Glatiramer Acetate/Teriflunomide/Dimethyl Fumarate/Azathioprine); 2ndLine Long (2nd LineL) (continuous therapy: Fingolimod/Ocrelizumab/ Rituximab/Natalizumab/ Siponimod); 2nd Line Short (2nd LineS) (pulsed therapy: Alemtuzumab/ Mitoxantrone/ Cladribine/ Cyclophosphamide/ Methotrexate); these could

be combined into nine different therapeutic sequences. The SAEs evaluated were: infections, grade III-IV lymphopenia and neoplasms, in according to MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) classification available on Web application of Registry. Data were extracted in January 2022. Baseline characteristics of the patients (number, percentage of males, age and EDSS at first DMT, time from onset to the first treatment start) are described as median and interquartile range, and percentage, as appropriate. The rates of SAEs are represented as events every 1000 patients. When the patients switched from one drug to another, the incidence of SAEs is assessed in each therapeutic period. From a sample of 50,039 subjects, the selected cohort included 22,237 patients. Age at first DMT ranged, among the different groups from 32.1 (in patients switching from 1st Line to 2nd LineS) to 42.9 years (patients treated only with 2nd LineS), while the percentage of male patients from 27.6% (pwMS switching from 2nd LineL to 1st Line) to 36.7% (2nd LineS). The time from onset to the first drug was between 12.8 (in patients switching from 2nd LineL to 2nd LineS) and 62.0 months (2nd LineS). EDSS at first DMT prescription was lower in patients starting 1st Line and those switching from 1st Line to 2nd LineL (2.0). The incidence of evaluated SAEs varied between the therapeutic schemes. Infections were more frequent in 2nd Line treated patients than those in 1st Line (6.32 vs 46.56). Also neoplasm were more frequent in the 2nd Line than in the 1st Line (9.57 vs 2.50). In patients switching from 1st to 2nd line, the incidence of SAEs was higher in the 2nd line period. Surprisingly, lymphopenia was reported more frequently in patients treated with 1st Line than those in 2nd Line, data probably affected by the under reporting.

## CONCLUSIONS

These preliminary results are interesting for further analysis. Based on this exploratory analysis, a careful evaluation of the different SAEs during the therapeutic patient journey will be need to compare the different drug sequences using more appropriate complex models.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Paolicelli D. *PROfiling the risk of Severe Adverse Events during sequencing therapies in patients with multiple sclerosis: an observational cohort analysis based on Italian Multiple Sclerosis Registry. Oral Communication, 52° SIN Congress, Milano*

# Rete internazionale Big Multiple Sclerosis Data (BMSD)



## Maria Trojano

Università degli Studi di Bari Aldo Moro - Dipartimento di Biomedicina Traslazionale e Neuroscienze - DiBrain

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Pietro Iaffaldano, Giuseppe Lucisano**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari; Center for Outcomes Research and Clinical Epidemiology (CORESEARCH), Pescara, Italia

### GRUPPO DI STUDIO NETWORK BMSD/ BMSD NETWORK STUDY GROUP

**Jan Hillert, Anna Glaser**, Swedish MS Register

**Melinda Magyari**, Danish MS Register

**Sandra Vukusic**, OFSEP

**Dana Horakova**, Czech Republic MS Register

**Helmut Butzkueven, Anneke Van Der Walt, Orla Gray**, MSBase

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**All the PI of all the MS centers participating to the Italian MS Registry**

## PREMESSE E OBIETTIVI

Nel 2013, cinque registri SM (registro SM Italiano, precedentemente noto come rete iMEDweb, SMSReg Svedese, MSBase con sede in Australia, OFSEP della Francia e il registro MS Danese) hanno iniziato a valutare il potenziale, l'utilità e i potenziali percorsi di collaborazione e/o messa in comune dei dati per la ricerca sulla diagnosi, epidemiologia e trattamento della SM - Big MS Data Network (BMSD). Tra il 2014 e il 2015 è stata condotta una fase di fattibilità, composta da queste fasi: descrizione dei registri; confronto dei registri in termini di struttura di governance, strumenti di raccolta dati e sistemi di archiviazione dati, disponibilità di variabili chiave per la ricerca sulla SM. La governance della rete BMSD è composta da: un comitato direttivo composto dai principal investigator di ciascun registro; un sottocomitato di gestione dei dati composto dagli analisti dei dati coinvolti nella gestione dei dati di ciascun registro; un comitato di analisi statistica composto da statistici e dai project leader dei progetti di ricerca.

Al termine della fase di fattibilità è stato deciso di avviare tre progetti dimostrativi al fine di testare la capacità di mettere in comune dati provenienti da fonti diverse, lavorando anche sull'armonizzazione della struttura dei dati,

della definizione degli outcome e sull'analisi dei dati. Questi i titoli dei progetti insieme al registro che ha condotto l'analisi: Efficacia a lunghissimo termine dei DMT nella SM - Registro Italiano SM; Frequenza di interruzione dei DMT - Registro MS Svedese; Efficacia dei DMT nella SM progressiva - MSBase.

## RISULTATI

Di seguito sono riportati gli obiettivi e i principali risultati ottenuti da questi progetti.

1. Efficacia a lunghissimo termine dei DMT nella SM - Registro Italiano SM: Lo scopo era valutare l'impatto dell'intervallo di tempo dall'esordio della malattia all'avvio del primo DMT sull'effetto del trattamento sull'accumulo di disabilità a lungo termine.

Sono stati valutati quattro outcome: peggioramento della disabilità confermata a 3 e 12 mesi e assegnazione di EDSS 4.0 o EDSS 6.0 irreversibili.

Nella prima fase della nostra analisi, sono stati utilizzati quattro modelli di regressione di Cox per stimare il rischio di raggiungere ciascuno dei 4 outcome. Il tempo dall'esordio della malattia al primo DMT è stato incluso come quintili e il primo quintile è stato incluso come classe di riferimento.

Nella seconda fase di questa analisi, è stata utilizzata la tecnica del propensity score (PS) per effettuare confronti a coppie tra i pazienti raggruppati in base al tempo dall'insorgenza della malattia al primo DMT.

La coorte finale ottenuta applicando i criteri di inclusione era composta da 11.871 pazienti con SMRR.

Un evento di peggioramento della disabilità confermato a 3 e 12 mesi e punteggi EDSS irreversibili di 4,0 e 6,0 sono stati raggiunti rispettivamente da 7.062 (59,5%), 4.138 (34,9%), 3.209 (31,1%) e 1.909 (16,5%) pazienti.

Il rischio di raggiungere tutti gli esiti della disabilità era significativamente più basso ( $p < 0,0004$ ) per il gruppo di pazienti del 1° quintile. Questi dati rappresentano la più grande coorte di RRMS con il follow-up più lungo mai analizzato per determinare l'efficacia a lungo termine dell'inizio precoce dei DMT. I nostri risultati indicano che il momento ottimale per iniziare un DMT nella SM per prevenire l'accumulo di disabilità a lungo termine è entro 12 mesi dall'esordio della malattia.

2. Frequenze di interruzione dei DMT - Registro Svedese SM: l'obiettivo di questo studio era descrivere i pattern di interruzione dei DMT. Sono state raccolte informazioni su 269.822 episodi di trattamento in 110.326 pazienti, dal 1997 al 2016. L'interruzione del trattamento è stata definita come la fine della DMT registrata dal medico per qualsiasi motivo e includeva interruzioni del trattamento, passaggio a DMT alternativi e interruzioni a lungo termine o permanenti. L'incidenza dell'interruzione della DMT durante l'intero periodo di osservazione era più bassa nei pazienti che ricevevano fingolimod (19,7 per 100 anni-persone (PY) di trattamento; IC 95% 19,2-20,1), seguito da natalizumab (22,6/100 PY; IC 95% 22,2-23,0) e IFNb (23,3/100 PY; IC 95% 23,2-23,5). Delle 184.013 interruzioni DMT osservate, 159.309 (86,6%) sono state seguite

dal passaggio ad un DMT alternativo entro 6 mesi. I motivi della sospensione dei DMT sono rimasti per lo più stabili nel tempo con un leggero aumento negli ultimi anni, con la disponibilità di più DMT. I risultati suggeriscono che l'interruzione di MS DMT è principalmente dovuta alle proprietà DMT e, in misura minore, alla gestione del rischio clinico.

3. Efficacia dei DMT nella SM progressiva - MSBase: l'obiettivo era identificare sottogruppi di pazienti SPMS con traiettorie longitudinali di EDSS simili nel tempo. I punteggi EDSS longitudinali sono stati analizzati da un modello denominato latent class mixed model (LCMM), utilizzando una funzione non lineare del tempo dalla prima visita EDSS con un valore EDSS da 3 a 4.

Un totale di 3613 SPMS è stato analizzato. LCMM ha rilevato 3 diversi sottogruppi di pazienti con una traiettoria di disabilità lieve, moderata e grave. Il tempo mediano per EDSS 6 è stato di 12,2, 5 e 1,7 anni, rispettivamente per i 3 gruppi. I pazienti con il decorso del tempo di disabilità "grave" erano più giovani ( $p < 0,001$ ) e con una durata della malattia più breve al basale ( $p < 0,001$ ). Questi risultati indicano che per il trattamento della SPMS e nella progettazione di studi clinici futuri l'esistenza di classi eterogenee di pazienti potrebbe avere importanti implicazioni.

## CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati ottenuti dalla rete BMSD forniscono prove che la condivisione dei dati tra i registri SM è fattibile e può fornire una potenza statistica sufficiente per rilevare l'impatto del trattamento sugli esiti della disabilità a lungo termine e per selezionare specifiche sottopopolazioni che potrebbero aver bisogno di un approccio terapeutico più personalizzato.

## Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network

### INTRODUCTION AND AIMS

In 2013, five MS registries (Italian MS registry, formerly known as iMEDweb network, SMSReg of Sweden, MSBase based in Australia, OFSEP of France and the Danish MS registry) started to evaluate the potential, usefulness and potential paths of collaboration and/or pooling of data for research on the diagnosis, epidemiology and treatment of MS - the Big MS Data Network (BMSD).

A feasibility phase was carried out between 2014 and 2015. This feasibility evaluation comprised the following steps: registries descriptions; registries comparison in terms of governance structure, data collection tools and data storage systems, availability of key variables for MS research.

The governance of the BMSD network has been established as follow: a steering committee composed by the

principal investigator of each involved registry; a data management subcommittee composed by data analysts involved in the data management of each dataset; a statistical analysis committee composed by statisticians and project leaders of the research projects.

At the end of the feasibility phase was decided to launch three demonstrator projects in order to test the capability to pool data which come from different sources, working also on the harmonization of the data structure, outcomes definitions and data analysis.

The following were the title of the projects along with the leading registry: Very long-term effectiveness of DMTs in multiple sclerosis - Italian MS Registry; Discontinuation frequencies of DMTs - Swedish MS Registry; Efficacy of DMTs in progressive MS - MSBase.

## RESULTS

Here are reported the objectives and the main results obtained from these projects.

1. Very long-term effectiveness of DMTs in multiple sclerosis - Italian MS Registry: The aim was to evaluate the impact of the time interval from disease onset to the first DMT on the treatment effect on long-term disability accumulation.

Four study outcomes were evaluated: 3- and 12-month Confirmed Disability Worsening (CDW) and assignment of either irreversible EDSS 4.0 or EDSS 6.0.

In the first step of our analysis, four Cox regression models were used to estimate the risk of reaching each of the 4 outcomes. The time from disease onset to the first DMT start was included as quintiles and the first quintile was included as reference class.

In the second step of this analysis, propensity score (PS) matching was used to enable pairwise comparisons among patients grouped by the time from disease onset to the first DMT start.

The final cohort, obtained by applying the inclusion criteria, was composed by 11,871 RRMS patients.

A 3- and 12-month confirmed disability worsening event and irreversible EDSS 4.0 and 6.0 scores were reached by 7,062 (59.5%), 4,138 (34.9%), 3,209 (31.1%) and 1,909 (16.5%) patients, respectively.

The risk of reaching all the disability outcomes was significantly lower ( $p < 0.0004$ ) for the 1st quintile patients' group. These data represent the largest RRMS cohort with the longest follow-up ever analysed to determine the long-term effectiveness of the early initiation of DMTs. Our results indicate that the optimal time to start DMTs in MS to prevent long-term disability accumulation is within 12 months of disease onset.

2. Discontinuation frequencies of DMTs - Swedish MS Registry: The objective of this study was to describe treatment interruption and discontinuation in the BMSD network. Information on 269,822 treatment episodes in 110,326 patients from 1997 to 2016 were retrieved. Treatment stop was defined as a clinician recorded DMT end for any reason and included treatment interruptions, switching to alternate DMTs and long-term or permanent discontinuations. The incidence of DMT stopping cross the

full observation period was lowest in fingolimod (19.7 per 100 person-years (PY) of treatment; 95% CI 19.2–20.1), followed by natalizumab (22.6/100 PY; 95% CI 22.2–23.0), IFNb (23.3/100 PY; 95% CI 23.2–23.5). Of the 184,013 observed DMT stops, 159,309 (86.6%) switched to an alternate DMT within 6 months. DMT stopping reasons and rates were mostly stable over time with a slight increase in recent years, with the availability of more DMTs. The results suggest that discontinuation of MS DMTs is mostly due to DMT properties and to a lesser extent to risk management and a competitive market.

3. Efficacy of DMTs in progressive MS - MSBase: The objective was to identify subgroups of SPMS patients with similar longitudinal trajectories of EDSS over time. Longitudinal EDSS scores were modelled by a latent class mixed model (LCMM), using a nonlinear function of time from the first EDSS visit with an EDSS value of 3 to 4.

A total of 3613 SPMS (66.2% females; 39.1% from France, 24.4% from Italy, 19.6% MSBase, 16.9% Sweden). LCMM detected 3 different subgroups of patients with a mild, a moderate and a severe disability trajectory. Median time to EDSS 6 was 12.2, 5 and 1.7 years, for the 3 groups respectively. Patients with the "severe" disability time course were younger ( $p < 0.001$ ) and with a shorter disease duration at baseline ( $p < 0.001$ ). Heterogeneity among the four Registries was also observed ( $p < 0.001$ ) with a higher frequency of patients with milder MS in the French (39.2%) and Swedish (43.9%) registries. We observed a higher frequency of moderate MS in the Italian (59.6%) and MSBase (55.6%) registries. This results indicate that for the treatment of SPMS and in the design of future clinical trials, with time to confirmed EDSS progression as the primary endpoint, the existence of heterogeneous classes of patients could have important implications.

## CONCLUSIONS

In conclusions, the results obtained by the BMSD network provide evidence that data sharing among MS registries and databases is feasible and can provide enough statistical power to detect the impact of treatment on disability outcomes over the long term and to select specific sub-population that may need a more tailored treatment approach.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- Iaffaldano P, Lucisano G, Butzkueven H, Hillert J, Hyde R, Koch-Henriksen N, Magyari M, Pellegrini F, Spelman T, Sørensen PS, Vukusic S, Trojano M. Early treatment delays long-term disability accrual in RRMS: Results from the BMSD network. *Mult Scler.* 2021 Sep;27(10):1543-1555. doi: 10.1177/13524585211010128
- Hillert J, Magyari M, Soelberg Sørensen P, Butzkueven H, Van Der Welt A, Vukusic S, Trojano M, Iaffaldano P, Pellegrini F, Hyde R, Stawiarz L, Manouchehrinia A, Spelman T. Treatment Switching and Discontinuation Over 20 Years in the Big Multiple Sclerosis Data Network. *Front Neurol.* 2021 Mar 17;12:647811 doi:10.3389/fneur.2021.647811
- Signori A, Lorscheider J, Vukusic S, Trojano M, Iaffaldano P, Hillert J, Hyde R, Pellegrini F, Magyari M, Koch-Henriksen N, Sørensen PS, Spelman T, van der Walt A, Horakova D, Havrdova E, Girard M, Eichau S, Grand'Maison F, Gerlach O, Terzi M, Ozakbas S, Skibina O, Van Pesch V, Sa MJ, Prevost J, Alroughani R, McCombe PA, Gouider R, Mrabet S, Castillo-Trivino T, Zhu C, de Gans K, Sánchez-Menoyo JL, Yamout B, Khoury S, Sormani MP, Kalincik T, Butzkueven H; Big MS Data Network. Heterogeneity on long-term disability trajectories in patients with secondary progressive MS: a latent class analysis from Big MS Data network. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2023 Jan;94(1):23-30. doi: 10.1136/jnnp-2022-329987. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36171104

Website: <https://bigmsdata.org>

# Analisi retrospettiva non interventistica del Registro Italiano SM per valutare l'impatto dell'attività di malattia nelle scelte terapeutiche durante le fasi recidivante e progressiva attiva di sclerosi multipla



## Maria Trojano

Università degli Studi di Bari Aldo Moro - Dipartimento di Biomedicina Traslazionale e Neuroscienze - DiBraiN

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Pietro Iaffaldano, Tommaso Guerra, Damiano Paolicelli**

**Giuseppe Lucisano**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso Università di Bari, Bari; Center for Outcomes Research and Clinical Epidemiology (CORESEARCH), Pescara, Italia

**Maria Trojano**, on behalf of the Italian MS Register

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Francesco Patti**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, GF Ingrassia, Sezione Neuroscienze, Centro Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

**Eleonora Cocco**, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Centro Sclerosi Multipla, ATS Sardegna, Cagliari, Italia

**Giovanna De Luca**, Centro Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Policlinico SS Annunziata, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara, Italia

**Vincenzo Brescia Morra**, Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

**Carlo Pozzilli**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale S. Andrea, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

**Mauro Zaffaroni**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale di Gallarate, ASST della Valle Olona, Gallarate (VA), Italia

**Patrizia Sola**, Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Neurologia, Università di Modena e Reggio Emilia, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino/Estense, Modena, Italia

**Claudio Gasperini**, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale San Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Giuseppe Salemi**, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

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

**Giacomo Lus**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Matilde Inglese**, Dipartimento Di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica E Scienze Materno - Infantili (DINOEMI), Università degli Studi di Genova; Ospedale Policlinico San Martino, IRCCS, Genova, Italia

**Silvia Romano**, Centro di Terapie Neurologiche Sperimentali (CENTERS), Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

**Paolo Bellantonio**, Unità di Neurologia e Neuroriabilitazione, IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italia



- Maria Gabriella Coniglio**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale ASL 4 "Madonna Delle Grazie", Matera, Italia
- Giorgia Teresa Maniscalco**, Neurologia e Stroke Unit; Centro Sclerosi Multipla Ospedale A. Cardarelli, Napoli, Italia
- Antonella Conte**, Unità di Neurologia e Neuroriabilitazione, IRCCS Neuromed, Pozzilli; Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Italia
- Alessandra Lugaresi**, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università 'Alma Mater Studiorum' di Bologna, Bologna, Italia
- Marika Vianello**, O.U. Neurologia, Ospedale Ca' Foncello, Unità SM, Treviso, Italia
- Paolo Agostino Confalonieri**, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia
- Marco Capobianco**, Dipartimento di Neurologia, Centro Regionale di Sclerosi Multipla, Ospedale Universitario San Luigi, Orbassano, Torino, Italia
- Ilaria Pesci**, Unità di Neurologia, Ospedale Vaio-Fidenza, Parma, Italia
- Franco Granella**, Unità di Neuroscienze, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma, Parma, Italia
- Rocco Totaro**, Centro Malattie Demyelinizzanti, Clinica Neurologica, Ospedale San Salvatore, L'Aquila, Italia
- Girolama Alessandra Marfia**, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università e Ospedale di Tor Vergata, Roma, Italia
- Maura Chiara Danni**, Clinica Neurologica, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche, Ancona, Italia
- Paola Cavalla**, Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Neuroscienze e Salute Mentale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italia
- Paola Valentino**, Centro Sclerosi Multipla, Policlinico Universitario, Campus Germaneto, Catanzaro, Italia
- Umberto Aguglia**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Magna Grecia di Catanzaro, Catanzaro, Italia
- Sara Montepietra**, Centro Sclerosi Multipla, Arcispedale Santa Maria Nuova, AUSL Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italia
- Elisabetta Ferraro**, Centro Sclerosi Multipla - PO San Filippo Neri - ASL Roma 1, Roma, Italia
- Alessandra Protti**, Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Neurologia, Ospedale Niguarda, Milano, Italia
- Daniele Spitaleri**, Centro Sclerosi Multipla, Unità di Neurologia, Ospedale San G. Moscati, Avellino, Italia
- Carlo Avolio**, Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia, Italia
- Elio Scarpini**, Centro Sclerosi Multipla, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Milano, Italia
- Davide Maimone**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Garibaldi Nesima, Catania, Italia
- Gioacchino Tedeschi**, Centro Sclerosi Multipla. Divisione II di Neurologia, Università della Campania "L. Vanvitelli", Napoli, Italia
- Maria Sessa**, Centro Provinciale Sclerosi Multipla, ASST papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italia
- Marco Rovaris**, Centro Sclerosi Multipla, Istituto Scientifico, Fondazione Don Carlo Gnocchi, Milano, Italia
- Francesca De Robertis**, Ambulatorio Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Lecce, Italia
- Augusto Rini**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale A. Perrino, Brindisi, Italia
- Ardito Bonaventura**, Centro Sclerosi Mutipla, UOC Di Neurologia, Ospedale Della Murgia Fabio Perinei, Altamura (BA), Italia
- Mihaela Nica**, Novartis Farma S.p.A, Milano, Italia
- Maria Pia Amato**, Dipartimento NEUROFARBA, Università di Firenze; IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia
- Massimo Filippi**, Unità di Neurologia e Neuroriabilitazione, Servizio di Neurofisiologia, Unità di Ricerca di Neuroimaging, Divisione di Neuroscienze, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il decorso clinico della SM è sempre più considerato come un continuum ma la classificazione nei fenotipi clinici classici rimane fondamentale nella pratica clinica e nel mondo accademico. A circa l'85% delle persone con SM viene inizialmente diagnosticata la forma recidivante-remittente della malattia, in genere in una età compresa tra 20 e 40 anni. La SM progressiva primaria (SMPP) non è considerata un'entità separata ma parte dello spettro della malattia progressiva, inclusa la complessa definizione di SM secondariamente progressiva (SMSP)

Inoltre, diversi trial clinici recentemente pubblicati hanno incluso pazienti con SM recidivante (SMR), una categoria che comprende pazienti affetti da SMRR e SPMS attivi, e di conseguenza le autorità regolatorie del farmaco hanno concesso l'autorizzazione all'uso di questi DMT a pazienti con SMR.

Lo scenario terapeutico per i pazienti con SM si è ampiamente allargato negli ultimi 20 anni, ma nonostante il trattamento farmacologico un'ampia percentuale di pazienti continua a sperimentare attività di malattia clinica e sub-clinica.

I motivi per una risposta non ottimale ai DMT possono variare considerando la natura altamente eterogenea della malattia, ma il passaggio dei pazienti che sperimentano una risposta al trattamento non ottimale ad un DMT a un'opzione più efficace è fondamentale per ridurre al minimo l'accumulo di disabilità e ritardare la progressione della malattia. Nei pazienti che presentano un fallimento del trattamento di prima linea o che presentano un alto rischio di riattivazione della malattia dopo l'interruzione del trattamento, è ragionevole considerare terapie altamente efficaci.

L'obiettivo primario di questo studio è di valutare le caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti affetti da RMS nel Registro Italiano Sclerosi Multipla (IMSR), al fine di valutare la percentuale di pazienti che cambiano DMT a causa dell'attività della malattia, definita come insorgenza di recidive, e di descrivere i diversi fattori determinanti nelle scelte terapeutiche durante le fasi recidivante e progressiva attiva di sclerosi multipla.

## RISULTATI

Lo studio è stato condotto utilizzando dati clinici longitudinali, acquisiti retrospettivamente, estratti dal registro italiano della SM.

Sono stati estratti dal database IMSR i pazienti con decorso della malattia SMRR e SMSP, con follow-up  $\geq 5$  anni, con una prima visita entro 3 anni dall'esordio della malattia e almeno 3 valutazioni del punteggio EDSS (Expanded Disability Status Scale).

Per definire i fenotipi della SM, abbiamo utilizzato le seguenti definizioni:

- Definizione SMRR secondo i criteri McDonald 2010;
- Definizione SMSP: definizione SMSP data-driven basata su una versione modificata dell'algoritmo di Lorscheider (DDA);
- SMRR e SMSP attivi: pazienti SMRR e SMSP con almeno una ricaduta negli ultimi 2 anni di follow-up;
- SMR: sommatoria dei pazienti con SMRR attiva e SMSP attiva (come sopra).

Per valutare l'impatto dell'attività della malattia nella scelta della strategia terapeutica, abbiamo prima determinato la percentuale di pazienti con recidive verificatesi durante il trattamento, quindi abbiamo valutato come queste potessero influenzare il cambio di trattamento.

L'effetto di fattori demografici, clinici e dei DMT sulla probabilità di cambiare il trattamento è stato valutato utilizzando modelli di regressione logistica multivariata.

Il ruolo dell'esposizione ai DMT è stato valutato in 2 diversi modelli diversificati sulla base della tipologia di trattamento: ultimo DMT registrato o ultimo DMT raggruppato in base alla efficacia e meccanismo d'azione (MoA) (DMT ad efficacia moderata (ME), DMT ad alta efficacia (HE), farmaci anti-CD20).

La coorte finale era composta da 21.174 pazienti con SMRR e 1.153 pazienti con SMSP. Utilizzando una definizione clinica, abbiamo identificato 4.161 RR (19,7%) e 578 SP (50,1%) pazienti attivi, di cui 2694 (56,8%) hanno cambiato DMT. I pazienti con SMRR erano significativamente più giovani (anni, mediana (IQR): 36,50 (29,10-44,80) vs 39,60 (32,80-48,00),  $p < 0,0001$ ), meno disabili (punteggio EDSS mediano (IQR): 2,00 (1,00-3,50) vs 2,50 (1,50-4,00),  $p < 0,0001$ ), più frequentemente affetti da un decorso della malattia RR (89,8% vs 85,2%,  $p < 0,0001$ ) rispetto ai pazienti non attivi. Il modello di regressione logistica multivariata ha rivelato che l'esposizione a Alemtuzumab (OR 0,08 IC 95% 0,02-0,37), Natalizumab (OR 0,48 IC 95% 0,30-0,76), Ocrelizumab (OR 0,1 IC 95% 0,02-0,45) e Rituximab (OR 0,23 95% CI 0,06-0,82) era fattore protettivo contro il cambio di trattamento dovuto a ricadute rispetto ai pazienti esposti alle varie formulazioni di interferone beta. Il nostro modello ha anche rivelato che l'uso di HE DMTs era un fattore protettivo rispetto al cambio di trattamento a causa di una ricaduta (OR 0,43 IC 95% 0,31-0,59), soprattutto considerando i farmaci anti-CD20 (OR 0,14 IC 95% 0,05-0,37) in confronto con l'uso di ME DMT.

## CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri risultati hanno mostrato che l'attività clinica della malattia è un importante fattore determinante la scelta di cambiare trattamento nei pazienti con SMR. I farmaci ad alta efficacia, in particolare quelli con MoA anti-CD20, riducono significativamente il rischio di attività della malattia nella SMR.

# EPID-MS Evaluation of the drivers of the therapy switch in active RRMS and active SPMS patients

## INTRODUCTION AND AIMS

The clinical course of MS is increasingly considered as a continuum but the classification in classic clinical phenotypes remains fundamental in clinical practice and academic world. Approximately 85% of people with MS are initially diagnosed with the relapsing-remitting form of MS (RRMS), typically between the ages of 20 and 40 years. Primary progressive MS (PPMS) is not considered as a separate entity but part of the spectrum of progressive disease, including the challenging definition of secondary progressive MS (SPMS).

Moreover, different recently published therapeutic studies have included patients with relapsing MS (RMS), a term that comprises active RRMS and SPMS patients, and consequently health authorities have granted the authorization of DMTs to patients with RMS.

The therapeutic scenario for MS patients has widely expanded during the past 20 years but a large proportion of patients continue to experience clinical and subclinical disease activity.

Reasons for suboptimal response to DMTs may vary considering the highly heterogeneous nature of the disease, but switching patients who experience a suboptimal treatment response on one DMT to a more effective option is crucial to minimize the accumulation of disability and delay disease progression. In patients who experience first-line treatment failure or who have a high risk of reactivation of the disease after discontinuation of treatment, it is reasonable to consider highly effective therapies.

The primary objective of this study is to assess clinical and therapeutic characteristics of the RMS patients in the Italian Multiple Sclerosis Registry (IMSR), in order to evaluate the percentage of patients switching DMT due to disease activity, defined as occurrence of relapses, and to describe the different drivers of treatment patterns during the disease course.

## RESULTS

The study has been conducted using longitudinal, retrospectively acquired clinical data extracted from the Italian MS register.

Patients with RRMS and SPMS disease course, with  $\geq 5$  year follow-up, with a first medical visit within 3 years from the disease onset and at least 3 Expanded Disability Status Scale (EDSS) score evaluations were extracted from the IMSR database.

In order to define the MS phenotypes, we used the following definitions:

- RRMS definition according to McDonald 2010 criteria;
- SPMS definition: data-driven SPMS definitions based on a modified version of the Lorscheider's algorithm (DDA);
- Active RRMS and SPMS: RRMS and SPMS with at least one relapse in the last 2 years of follow up available;
- All RMS: Population of all patients with active RRMS and active SPMS (as above).

To evaluate the impact of disease activity in the choice of the next therapeutic strategy, we have first determined the proportion of patients with relapses occurred during treatment, then we evaluated how these disease activity measures can influence the treatment switch.

The effect of demographic, clinical and DMT exposure on the risk of treatment switch was assessed using multivariable logistic regression models.

The role of DMTs exposure was assessed in 2 different models including: last recorded DMT or last DMTs grouped according to their efficacy and mechanism of action (MoA) (moderate efficacy (ME), high efficacy (HE) DMTs, anti-CD20 drugs).

The final cohort was composed of 21,174 RRMS and 1,153 SPMS patients. Using a clinical definition, we identified 4,161 RR (19.7%) and 578 SP (50.1%) active patients, of whom 2694 (56.8%) switched DMT. RMS patients were significantly younger (median (IQR) years: 36.50 (29.10-44.80) years vs 39.60 (32.80-48.00),  $p < 0.0001$ ), less disabled (median (IQR) EDSS score: 2.00 (1.00-3.50) vs 2.50 (1.50-4.00),  $p < 0.0001$ ), more frequently affected by a RR disease course (89.8% vs 85.2%,  $p < 0.0001$ ) in comparison with not active patients. The multivariable logistic regression model performed revealed that Alemtuzumab (OR 0.08 95% CI 0.02-0.37), Natalizumab (OR 0.48 95% CI 0.30-0.76), Ocrelizumab (OR 0.1 95% CI 0.02-0.45) and Rituximab (OR 0.23 95% CI 0.06-0.82) were protective factors against treatment switch due to relapses in comparison with patients exposed to Interferon beta products. Our model also revealed that the use of HE DMTs was a protective factor against the treatment switch due to a relapse (OR 0.43 95% CI 0.31-0.59), especially considering anti-CD20 drugs (OR 0.14 95% CI 0.05-0.37) in comparison with the use of ME DMTs.

## CONCLUSIONS

In conclusions, our results showed that clinical disease activity is an important trigger of treatment switch in RMS patients. HE DMTs, especially those with anti-CD20 MoA, significantly reduce the risk of disease activity in RMS.



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

### *Poster presentation*

- 38th Congress ofECTRIMS - OCTOBER 2022: "Drivers of therapy switch in relapsing multiple sclerosis: a study from the Italian MS Registry" - Session Title: Poster Session 1; Session Date: 26.10.2022; Presenting Time: 16:30 h; Poster Number: P371
- 52° SIN Congress - Milano 2022: "Evaluation of determinants of therapy switch in Relapsing Multiple Sclerosis: a study from the Italian MS Register" - Session Title: Poster Session Multiple Sclerosis 1; Session

# Trapianto di cellule staminali ematopoietiche in persone con sclerosi multipla progressiva secondaria attiva: uno studio comparativo con pazienti di controllo del Registro Italiano Sclerosi Multipla



## Matilde Inglese

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

### PRINCIPAL INVESTIGATORS

**Matilde Inglese, Giacomo Boffa**, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI) Università degli Studi di Genova, Genova, Italia  
On behalf of the Italian BMT-MS Study Group and the Italian MS Register

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Maria Pia Sormani, Alessio Signori**, Unità di Biostatistica, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

**Luca Massacesi, Alice Mariottini, Anna Maria Repice**, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino e Seconda divisione di Neurologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze, Italia

**Elvira Sbragia**, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

**Salvatore Cottone**, Dipartimento di Neurologia, A.R.N.A.S. CIVICO, Palermo, Italia

**Maria Pia Amato**, Dipartimento NEUROFARBA, Sezione di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Firenze, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze, Italia

**Claudio Gasperini**, Dipartimento di Neurologia, Ospedale San Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Massimo Filippi, Lucia Moiola**, Unità di Neurologia, Unità di Neuroriabilitazione, Servizio di Neurofisiologia, Unità di Ricerca di Neuroimaging, Divisione di Neuroscienze, Università Vita-Salute San Raffaele, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

**Stefano Meletti**, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Neurologia, Azienda Ospedaliera Universitaria, Modena, Italia

**Vincenzo Brescia Morra**, Dipartimento di Neuroscienze e Scienze riproduttive ed odontostomatologiche, Università "Federico II," Napoli, Italia

**Giuseppe Salemi**, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi Palermo, Italia

**Francesco Patti**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, AOU Policlinico-San Marco, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

**Giovanna De Luca**, Centro MS, Unità di Neurologia, Ospedale Universitario SS. Annunziata, Chieti, Italia

**Giacomo Lus**, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Seconda Divisione di Neurologia, Napoli, Italia

**Mauro Zaffaroni**, Centro MSM, ASST della Valle Olona, Ospedale di Gallarate, Italia



**Patrizia Sola**, Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Neurologia, Azienda Ospedaliera Universitaria, Modena, Italia

**Antonella Conte**, IRCCS Neuromed, Pozzilli (IS); Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università Roma, Italia

**Riccardo, Nistri, Silvia Romano**, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Sapienza Università, di Roma, Ospedale S. Andrea, Centro SM, Roma, Italia

**Umberto Aguglia**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Magna Grecia di Catanzaro, Italia

**Franco Granella**, Unità di Neuroscienze, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma, Italia

**Simonetta Galgani**, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale San Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Luisa Maria Caniatti**, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italia

**Alessandra Lugaresi**, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna, Bologna, Italia

**MariaTrojano, Pietro Iaffaldano**, Dipartimento di Scienze Mediche di base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

**Eleonora Cocco**, Centro SM, Ospedale Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

**Riccardo Saccardi**, Dipartimento di Terapie Cellulari e Medicina TrASFusionale, Policlinico Universitario Careggi, Firenze, Italia

**Emanuele Angelucci**, Ematologia e Centro Trapianti, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia

**Gian Luigi Mancardi**, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università degli Studi di Genova, Genova; Ospedale Policlinico IRCCS San Martino, Genova, Italia

#### CO-INVESTIGATORS FOR THE ITALIAN-BMT STUDY GROUP

**Marco Capobianco**, Dipartimento di Neurologia, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano, Italia

**Giovanni Bosco Zimatore**, Ospedale Generale Regionale "F. Miulli," Acquaviva delle Fonti, Italia

**Jessica Frau**, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

**Elio Scarpini**, Dipartimento di Neurologia, Università degli Studi di Milano, Italia

**Giuseppe Meucci**, Ospedale USL, Livorno, Italia

**Donata Guidetti**, Ospedale Guglielmo Da Saliceto Piacenza, Italia

**Francesca Gualandi**, Riccardo Varaldo, Anna Maria Raiola, Ematologia e Centro Trapianti, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia

**Chiara Innocenti**, Dipartimento di Terapie Cellulari e Medicina TrASFusionale, Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi, Firenze, Italia

**Valerio Zoli**, Dipartimento di Ematologia, Ospedale San Camillo-Forlanini, Roma, Italia

**Fabio Ciceri**, Raffaella Greco Dipartimento di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Università Vita-Salute San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

**Rosanna Scimè**, Dipartimento di Ematologia, Ospedale Villa Sofia, Palermo, Italia

**Marco De Gobbi**, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Unità Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche, Università degli Studi di Torino, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano, Italia

## PREMESSE E OBIETTIVI

Le terapie ad oggi disponibili per la Sclerosi Multipla Secondariamente Progressiva (SMSP) sono limitate. Studi preliminari suggeriscono che il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche (AHST) abbia la capacità di ridurre la progressione di disabilità nei pazienti con SPMS. In questo studio abbiamo voluto comparare l'efficacia a lungo termine di AHST rispetto ad altre immunoterapie utilizzate nei soggetti affetti da SMSP attiva.

Abbiamo analizzato i dati del Gruppo di Studio Italiano sul Trapianto autologo di cellule staminali e del Registro Italiano Sclerosi Multipla. Tutti i pazienti che hanno iniziato un'immunoterapia o sono stati sottoposti a AHST in seguito alla diagnosi di SMSP sono stati inclusi nello studio. L'effetto delle terapie sulla disabilità neurologica è stato confrontato tramite modelli di regressione di Cox, utilizzando la proporzione cumulativa di peggioramento di disabilità confermato a 6 mesi (misurato tramite la scala EDSS).

I principali obiettivi secondari comprendevano l'analisi dell'incidenza cumulativa di miglioramento della disabilità neurologica e la sua prevalenza nel tempo.

## RISULTATI

I due gruppi di trattamento (79 soggetti con SMSP sottoposti a AHST e 1975 trattati con altre immunoterapie) sono stati bilanciati tramite gli approcci propensity-score e overlap-weighting al fine di ridurre gli errori di allocazione nei due gruppi di trattamento. Il tempo alla progressione confermata di disabilità è risultato essere ritardato nei pazienti trattati con AHST (HR= 0.50; 95% CI: 0.31, 0.81; p=0.005), con il 61.7% dei pazienti trattati con AHST libero da progressione di disabilità a 5 anni. I pazienti sottoposti a AHST avevano inoltre probabilità più elevate di andar incontro ad un miglioramento sostenuto della disabilità neurologica: dopo 3 anni dal trattamento, il 34.7% dei pazienti trapiantati manteneva un miglioramento delle proprie condizioni neurologiche contro il 4.6% dei pazienti trattati con altre immunoterapie (p<0.001).

## CONCLUSIONI

Il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche è in grado di rallentare la progressione di disabilità neurologica nei soggetti affetti da SMSP ed è associato a probabilità più elevate di andar incontro ad un miglioramento della disabilità neurologica sostenuta nel tempo.

# Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Secondary Progressive Multiple Sclerosis: a comparative study with matched control patients from the Italian Multiple Sclerosis Register

## INTRODUCTION AND AIMS

Treatment of secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) remains unsatisfactory. Uncontrolled evidence suggests that autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHST) can be effective in people with active SPMS, as a result of the profound immune ablative effect of CNS-penetrant chemotherapy. In this study we compared the effect of AHST with that of other anti-inflammatory disease modifying therapies (DMT) on long-term disability worsening in active SPMS.

We collected data from the Italian-Bone-Marrow-Transplantation-Study-Group and the Italian-Multiple-Sclerosis-Register. Patients were considered eligible if treatment had been started after the diagnosis of SPMS. Disability worsening was assessed by the cumulative proportion of patients with a 6-months confirmed-disability-progression (CDP) according to the Expanded-Disability-Status-Scale (EDSS) score.

Key secondary endpoints were the EDSS time-trend after

treatment start and the prevalence of disability improvement over time. A linear mixed model with a time\*treatment group interaction was used to assess the longitudinal EDSS time-trends. Time to CDP was assessed by mean of proportional hazard Cox regression models. Prevalence of improvement was estimated according to a modified Kaplan-Meier estimator and compared between groups by bootstrapping the area under the curve.

## RESULTS

79 AHST-treated patients and 1975 patients treated with other DMT were matched to reduce treatment selection bias using propensity-score and overlap weighting approaches. Time to first CDP was significantly longer in transplanted patients (HR= 0.50; 95% CI: 0.31, 0.81; p=0.005), with 61.7% of transplanted patients free from CDP at 5 years. Accordingly, EDSS time-trend over 10 years was higher in patients treated with other DMT than in AHST-treated patients

(+0.157 EDSS points per year compared to -0.013 EDSS points per year; interaction  $p < 0.001$ ). Patients who underwent AH SCT were more likely to experience a sustained disability improvement: 34.7% of patients maintained an improvement (a lower EDSS than baseline) 3 years after transplant versus 4.6% of patients treated by other DMT ( $p < 0.001$ ).

## CONCLUSIONS

The use of AH SCT in people with active SPMS is associated with a slowing of disability progression and a higher likelihood of disability improvement compared to standard immunotherapy.



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

- Boffa G. et al Hematopoietic Stem Cell Transplantation in people with active Secondary Progressive Multiple Sclerosis, under review Neurology
- Boffa G.ECTRIMS 2022: Oral communication, Presenter: Young Investigator Award MSIF

# Studio OCREVID: l'utilizzo di OCRElizumab durante la pandemia da COVID-19 in Italia



## Antonio Gallo, Alvino Bisecco

Centro SM e Unità di Ricerca 3T-MRI, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate (DAMSS), Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Federica Matrone, Agnese Mascolo, Giacchino Tedeschi**

### COLLABORAZIONI CON ALTRI CENTRI / COLLABORATIONS WITH OTHER CENTERS

**Marco Capobianco**, SCDO Neurologia e Centro Referente Regionale per la Sclerosi Multipla, A.O.U. San Luigi, Orbassano (TO), Italia

**Giovanna De Luca**, Unità di Neurologia, Policlinico SS. Annunziata, Chieti, Italia,

**Massimo Filippi**, Unità di Neuroimaging Quantitativo; Divisione di Neuroscienze, Università Vita-Salute San Raffaele, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

**Franco Granella**, Unità di Neuroscienze, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma, Parma, Italia

**Giacomo Lus**, Centro SM, Divisione II di Neurologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

**Girolama Alessandra Marfia**, Unità Clinica e di Ricerca sulla Sclerosi Multipla, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università e Azienda Ospedaliera Tor Vergata, Roma, Italia

**Massimiliano Mirabella**, Centro Sclerosi Multipla, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS & Centro di ricerca Sclerosi Multipla (CERSM) - Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

**Francesco Patti**, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate, G. F. Ingrassia, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

**Maria Trojano**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari, Italia

**Massimiliano Copetti**, Unità di Biostatistica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia  
Italian MS Register Study Group

## PREMESSE E OBIETTIVI

Ocrelizumab (OCR) è un anticorpo monoclonale umano ricombinante anti-CD20, approvato per le forme recidivanti di SM (SMR) e per la SM primariamente progressiva (SMP). La dose iniziale di OCR è di 300 mg somministrata per via endovenosa (IV), seguita due settimane dopo da una seconda dose di 300 mg IV. Successivamente, l'OCR viene somministrato come infusione EV di 600 mg ogni sei mesi, a partire da sei mesi dopo la dose iniziale. Poiché la deplezione dei linfociti può teoricamente aumentare il rischio di sviluppare infezioni gravi, durante la pandemia

di COVID-19 sono emerse preoccupazioni sulla gestione dell'OCR e di altre terapie modificanti la malattia (DMT) simili nei pazienti con SM (pcSM). In questo contesto, la pandemia da COVID-19 ha rappresentato una sfida unica per i neurologi che gestiscono i pcSM, soprattutto in Italia, che è stata colpita precocemente e gravemente dalla pandemia. Di conseguenza, i Centri SM italiani hanno utilizzato diversi approcci gestionali per quanto riguarda le infusioni di OCR durante la pandemia. Al meglio delle nostre conoscenze, il presente studio è il primo studio multicentrico basato su registro a livello nazionale che mira a:

1. descrivere, in dettaglio, le conseguenze della prima (drammatica) ondata dell'epidemia di COVID-19 (periodo di osservazione: febbraio-giugno 2020) in Italia sulla gestione delle infusioni di OCR e indagare sui fattori predittivi che hanno determinato il ritardo delle infusioni OCR ;
2. valutare - nei pazienti con SMR - il possibile effetto del ritardo nelle infusioni di OCR sugli endpoint clinici (Annualized Relapse Rate [ARR]) e radiologici (nuove lesioni iperintense in T2 e/o nuove lesioni in T1-Gd+)

## RISULTATI

I dati sono stati estratti dalla banca dati del Registro SM italiano. L'intervallo di dosaggio standard (SID) è stato definito come un intervallo tra 2 infusioni di OCR  $\leq$  30 settimane; l'intervallo di dosaggio esteso (EID) è stato definito come un intervallo tra 2 infusioni di OCR  $>$  30 settimane nel periodo di osservazione. I risultati del presente studio mostrano che le infusioni di OCR sono state significativamente posticipate durante la prima ondata di

pandemia di COVID-19 in Italia. Non sono emersi fattori clinico-demografici come predittori del rinvio dell'infusione, ad eccezione dell'ubicazione dei centri per la SM nel Nord Italia, dove l'epidemia ha colpito per prima e duramente il sistema sanitario. Nonostante la significativa estensione dell'intervallo di infusione OCR, è stata registrata un'incidenza molto piccola di eventi clinici e radiologici totali nel periodo di follow-up in entrambi i gruppi EID e SID fino a 40 settimane.

## CONCLUSIONI

L'estensione degli intervalli di infusione di OCR oltre le 30 settimane e potenzialmente fino a 40 settimane potrebbe rappresentare un'opzione per i neurologi dei centri SM preoccupati dal rapporto rischio-beneficio di un trattamento immunosoppressivo in situazioni particolari come un'epidemia/pandemia virale, una campagna vaccinale o altre comorbidità/condizioni che potrebbero aumentare il rischio di infezioni opportunistiche o altri eventi avversi.

# OCREVID Study: the management of OCRElizumab during the coVID-19 pandemic in Italia

## INTRODUCTION AND AIMS

Ocrelizumab (OCR) is a recombinant human anti-CD20 monoclonal antibody, approved for relapsing forms of MS (RMS) and for primary progressive MS (PMS). The initial dose of OCR is 300 mg given intravenously (IV), followed two weeks later by a second 300 mg IV dose. Subsequently, OCR is given as a 600 mg IV infusion every six months, beginning six months after the starting dose. Since lymphocyte depletion may theoretically increase the risk of developing severe infections, concerns have emerged during COVID-19 pandemic about management of OCR and other similar Disease Modifying Therapies (DMTs) in patients with MS (pwMS). In this context, COVID-19 has represented a unique challenge for neurologists managing pwMS, especially in Italia, that was precociously and severely hit by the pandemic and had to face a long-lasting disruption of healthcare system. As a result, different management approaches were applied at Italian MS centers regarding OCR infusion schedules during the pandemic. At the best of our knowledge, the present study is the first nation-wide registry-based multicentric study aiming:

1. to describe, in detail, the consequences of the first (dramatic) wave of the COVID-19 outbreak (observation period: Feb-Jun2020) in Italia on the management and schedule of OCR therapy and to investigate predictive factors determining OCR infusions delay;
2. to evaluate - in patients with RMS - the possible effect of delayed OCR infusion schedule on clinical

(Annualized Relapse Rate [ARR]) and radiological endpoints (new T2-hyperintense lesions and/or new T1-Gd+ lesions)

## RESULTS

Data were extracted from the Italian MS Register database. Standard interval dosing (SID) was defined as an infusion interval  $\leq$  30 weeks; Extended interval dosing (EID) was defined as an infusion interval  $>$  30 weeks at the observation period. This study shows that OCR infusions were significantly postponed during the first wave of COVID-19 pandemic in Italia. No clinico-demographic factors emerged as predictors of infusion postponement, except for location of MS centers in the North of Italia, where the outbreak hit first and hard on the healthcare system. Despite the significant extension of OCR infusion interval, a very small incidence of total clinical and radiological event was recorded in the follow up period in both EID and SID groups up to 40 weeks.

## CONCLUSIONS

The extension of OCR infusion intervals beyond 30 weeks and potentially up to 40 weeks could represent an option for MS neurologists concerned by risk-benefit of an immunosuppressive treatment in particular situations such as a virus outbreak/pandemic, a vaccine campaign or other comorbidities/conditions that might enhance the risk of opportunistic infections or other adverse events.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- A. Bisecco, F. Matrone, M. Capobianco, G. De Luca, M. Filippi, F. Granella, G. Lus, G.A. Marfia, M. Mirabella, F. Patti, M. Trojano, A. Mascolo, M. Copetti, G. Tedeschi, A. Gallo, Italian MS Register; Management of ocrelizumab in MS patients during the COVID-19 pandemic: an observational registry-based study. 2022 European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Meeting – Amsterdam, the Netherlands
- A. Bisecco, F. Matrone, M. Capobianco, G. De Luca, M. Filippi, F. Granella, G. Lus, G.A. Marfia, M. Mirabella, F. Patti, M. Trojano, A. Mascolo, M. Copetti, G. Tedeschi, A. Gallo, Italian MS Register; Management of ocrelizumab in MS patients during the COVID-19 pandemic: an observational registry-based study. 2022 Italian Society of Neurology (SIN) Meeting, Milano, 3-6 Dec. 2022

# Attività di malattia nella sclerosi multipla e pandemia da SARS-COV2: studio di popolazione dal Registro Italiano Sclerosi Multipla (RISM)



## Marco Capobianco

SC Neurologia, AO S. Croce e Carle, Cuneo, Italia

### COLLABORATORI/COLLABORATORS

**Serena Martire**, Laboratorio di Neurobiologia, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano (TO), Italia

**Marianna Lo Re**, SC Neurologia, AOU S. Luigi, Orbassano (TO), Italia  
On behalf of Registro Italiano Sclerosi Multipla e malattie correlate

## PREMESSE E OBIETTIVI

I fattori ambientali, in particolare le infezioni, sono fattori di rischio per l'attività infiammatoria di malattia nella sclerosi multipla (SM). Scopo dello studio è valutare l'impatto della pandemia SARS-COV2 sull'attività della malattia nella popolazione con SM dal Registro Italiano SM (RISM). Confrontiamo l'incidenza dell'attività clinica/radiologica della malattia verificatasi durante la fase pandemica (gennaio 2020-luglio 2021) e il periodo pre-pandemico (gennaio 2018-luglio 2019) nella popolazione con SM seguita durante entrambi i periodi, in base alle diverse aree di residenza, che hanno subito un impatto differente nella prima fase pandemica da SARS-COV2. Studiamo inoltre potenziali differenze nel sistema funzionale neurologico interessato.

## RISULTATI

18669 pazienti su 72959 hanno avuto visite registrate nel periodo pre-pandemico e pandemico e sono stati analizzati. 4312 recidive sono state registrate in 3306 pazienti (17,7%, tasso di recidiva (RR)=0,23) nel periodo pre-pandemico, mentre sono state riportate 1206 recidive

in 1054 pazienti (5,6%, RR=0,06) nel periodo pandemico (chi-quadrato test,  $p < 0,0001$ ).

L'analisi delle potenziali differenze nel sistema funzionale coinvolto è stata limitata dal numero di dati mancanti tra i due periodi.

Un totale di 38182 dati MR sono stati riportati per 14382 pazienti nel periodo pre-pandemia mentre 20329 dati RM sono stati riportati per 9849 pazienti nella pandemia: 2194 (5,7%) e 912 (4,5%) scansioni positive al gadolinio sono state registrate rispettivamente nei due periodi (chi-quadrato,  $p < 0,0001$ ).

## CONCLUSIONI

Durante il periodo pandemico è stata osservata una ridotta attività della malattia rispetto alla pre-pandemia: ciò può essere attribuito a una diminuzione complessiva del rischio di infezioni come risultato delle restrizioni e del lockdown attuato (distanziamento sociale, strategie di isolamento e misure igieniche), a sostegno del ruolo delle infezioni virali come fattori scatenanti di attività infiammatoria di malattia nella SM.

# Multiple sclerosis disease activity and SARS-COV2 pandemic: a population based study from the Italian MS Registry

## INTRODUCTION AND AIMS

Environmental factors, in particular infections, are risk factors for multiple sclerosis (MS) disease activity. Aim of the study was to evaluate the impact of the SARS-COV2 pandemic on disease activity in the MS population from the Italian MS Registry (RISM).

We compare the incidence of clinical/radiological disease activity occurring during the pandemic phase (Jan 2020-Jul 2021) and the pre-pandemic period (Jan 2018-Jul 2019) in the MS population followed during both periods, according to different regions of residence. We investigated potential differences in the neurological functional system affected.

## RESULTS

18669 out of 72959 patients had visits registered in the pre-pandemic and pandemic periods and were analysed. 4312 relapses were registered in 3306 patients (17.7%, relapse rate (RR)=0.23) in the pre-pandemic

period, while 1206 relapses were reported for 1054 patients (5.6%, RR=0.06) in the pandemic period (chi-square test,  $p < 0.0001$ ). The exploration of potential differences in functional system involved was limited by the different number of missing data between the two periods. A total of 38182 MR data were reported for 14382 patients in the pre-pandemic period while 20329 MR data were reported for 9849 patients in the pandemic: 2194 (5.7%) and 912 (4.5%) gadolinium-positive scans were respectively recorded in the 2 period (chi-square,  $p < 0.0001$ ).

## CONCLUSIONS

A reduced disease activity was observed during the pandemic period compared to the pre-pandemic: this may be ascribed to an overall decrease in the risk of infections as results of lockdown, social distancing, isolation strategies and hygiene measures, supporting the role of viral infections as triggers of inflammation in MS.



## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

- *Poster presentation at the next EAN Congress (Budapest July, 1-4)*

**PROGETTI DI RICERCA  
E BORSE DI STUDIO FINANZIATI  
DA FISM 2022, 2021**

FUNDED RESEARCH PROJECTS  
AND FELLOWSHIPS 2022, 2021

---

# Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2022

## FISM funded research projects and fellowships 2022

### CAUSE DELLA SM E FATTORI DI RISCHIO / THE CAUSES OF MS AND RISK FACTOR

#### Rosella Mechelli

Università Telematica San Raffaele Roma, Dipartimento di Scienze Umane e Promozione della Qualità della Vita, Roma

#### I geni regolati da EBNA2 nella SM: studio di trascritti codificanti e non codificanti nel sangue e nel SNC

EBNA2- regulated genes in MS: coding and non-coding transcripts in blood and CNS

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 161.561 - 3 anni / years

#### Claudio Sette

Università Cattolica del Sacro Cuore, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Dipartimento di Neuroscienze, Roma

#### Ruolo della modulazione dell'espressione genica da parte di proteine di legame all'RNA sulle caratteristiche infiammatorie della sclerosi multipla

Impact of gene expression modulation by RNA binding proteins on inflammatory features in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

#### Barbara Serafini

Istituto Superiore di Sanità, Sect. Inflammatory and demyelinating diseases of the nervous system, Dept. Neurosciences, Roma

#### Infezione da virus di Epstein-Barr e strategie di evasione della risposta immunitaria nella sclerosi multipla: focus sull'asse PD-1/PD-L1

Epstein-Barr virus infection and immune evasion strategies in the multiple sclerosis brain: focus on the PD-1/PD-L1 axis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 53.685 - 2 anni / years

#### Caterina Veroni

Istituto Superiore di Sanità, Neuroscienze, Roma

#### Studio del legame tra infezione con EBV, aumentata espressione di BAFF geneticamente determinata e rischio di SM in Sardegna e nell'Italia continentale

Searching for a link between EBV infection status, genetically determined BAFF overexpression and MS risk in Sardinians and mainland Italians

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 187.845 - 3 anni / years

#### Massimo Costanza

Fondazione IRCCS, Istituto Neurologico Carlo Besta, Department of Clinical Neuroscience, Milano

#### Svelare le trappole di DNA extracellulare nella patologia autoimmune del sistema nervoso centrale

Unveiling extracellular DNA traps in autoimmune pathology of the central nervous system

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 82.235 - 2 anni / years

#### Luca De feo

Washington University in St. Louis, MO, School of Medicine, Neurology, Saint Louis MO (US)

#### Caratterizzazione del ruolo di Trem-2 nella maturazione oligodendrocitaria e in un modello di demielinizzazione del sistema nervoso centrale

Deciphering the contribution of TREM-2 to oligodendrocyte differentiation in CNS demyelination models

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 100.000 - 2 anni / years

#### Alberto Chiarugi

Università degli Studi di Firenze, Health Sciences, Dipartimento di Farmacologia, Firenze

#### Identificazione del ruolo della degenerazione assonale programmata nella progressione della SM

Deciphering the role of programmed axonal degeneration in MS progression

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 140.000 - 3 anni / years

## Costanza Gianni

Sapienza Università di Roma, Neuroscienze Umane, Roma

### **L'associazione tra la neuroinfiammazione cronica e la degenerazione della sostanza bianca nella sclerosi multipla: uno studio combinato 11C-PBR28 PET-MRI**

The association between white matter chronic neuroinflammation and degeneration in multiple sclerosis: a combined 11C-PBR28 PET-MRI study

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 33.600 - 1 anno / year

## Monica Biggio

Università degli Studi di Genova, DIMES, Genova

### **Studiare i riflessi blink nella sclerosi multipla attraverso sistemi spiegabili di intelligenza artificiale**

Disentangling Blink Reflexes in Multiple Sclerosis through explainable artificial intelligence systems

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 270.897 - 3 anni / years

## Gabriele Angelini

Università degli Studi di Verona, Medicina, Verona

### **Caratterizzazione dell'infiammazione meningeale durante encefalomielite autoimmune sperimentale: un ruolo per l'interazione neutrofilo-macrofago**

Characterisation of meningeal inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for neutrophil-macrophage interplay

Borsa di Ricerca / Research Fellowship

€ 50.000 - 2 anni / years

## Simone Patergnani

Università degli Studi di Ferrara, Department of Medical Sciences, Laboratory for Technologies of Advanced Therapies (LTTA), Ferrara

### **Coinvolgimento di HMGB1 nella sclerosi multipla: ruolo nella ferritinofagia e attivazione dell'inflammasoma AIM2**

Involvement of HMGB1 in Multiple sclerosis: role in ferritinophagy and AIM2 inflammasome activationsclerosis: a combined 11C-PBR28 PET-MRI study

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 144.000 - 2 anni / years

## DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE

## Francesca Benedetta Pizzini

Università degli Studi di Verona, Radiology, Department of Diagnostic and Public Health, Verona

### **Gradient Echo Plural Contrast Imaging (GEPCI): un nuovo MRI biomarker di neurodegenerazione in Sclerosi Multipla**

Gradient Echo Plural Contrast Imaging (GEPCI) technique: a novel MRI biomarker of neurodegeneration in Multiple Sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 60.000 - 1 anno / year

## Patrizia Pantano

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Neuroscienze Umane, Roma

### **Il ruolo della risonanza magnetica ad alto e ultra-alto campo nella previsione di progressione di disabilità nella sclerosi multipla**

Impact of imaging markers at high and ultra-high field MRI on MS disability progression

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 221.813 - 2 anni / years

## Clelia Dallanocce

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Milano

### **Sviluppo di nuovi radiotraccianti del recettore GPR17 per la diagnosi precoce della sclerosi multipla**

Development of new radiotracers targeting GPR17 receptor for the early diagnosis of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 75.000 - 3 anni / years

## VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

## Stefano Pluchino

University of Cambridge, Department of Clinical Neurosciences, Cambridge UK

### **Regolazione epigenetica dei processi di invecchiamento delle cellule staminali neurali nella sclerosi multipla progressiva (EMBRACE)**

The Epigenetic Programme of BRAin Stem Cell Aging in Progressive Multiple Sclerosis (EMBRACE)

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 349.558 - 3 anni / years

## Luca Muzio

Fondazione Centro San Raffaele, Neuroimmunology Unit, INSpe, Division of Neuroscience, Dibat, Milano

### **Proteine chimeriche REcTO per il trattamento della SM progressiva**

Hybrid REcTO proteins for the treatment of progressive MS

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 150.000 - 2 anni / years

## Cristina Rivellini

Vita-Salute San Raffaele University, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Neuromuscular Repair Unit, Milano

### **Impatto degli oligodendrociti senescenti sulla rimielinizzazione nel modello animale di Sclerosi Multipla Primariamente Progressiva Jab1 KO**

Role of OL-senescence on remyelination in the Jab1 KO mouse model of primary progressive MS

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship

€ 105.000 - 3 anni / years

## Fabio Bertozzi

IIT Istituto Italiano di Tecnologia, D3Farmachimica, Genova

### **Ligandi multitarget per la sclerosi multipla con proprietà sia antinfiammatorie che rimielinizzanti (MARs)**

Multitarget-directed Ligands for Multiple Sclerosis with combined Antiinflammatory and Remyelinating properties (MARs)

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 248.925 - 2 anni / years

## Claudio Procaccini

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto per l'Endocrinologia e Oncologia Sperimentale (IEOS-CNR), Napoli

### **Ruolo di specifici nutrienti nel controllo della tolleranza immunologica al self in corso di EAE**

Nutrient-specific control of immunological self-tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

## Giacomo Boffa

Università degli Studi di Genova, DINOGMI Dipartimento di Neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili, Genova

### **L'effetto Del Trapianto Autologo Di Cellule Staminali Ematopoietiche Sull'infiammazione Cronica Del SNC Nella Sclerosi Multipla: Uno Studio Combinato MRI/PET**

Using MRI And TSPO-PET To Study The Effect Of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation On Compartmentalized CNS Inflammation In Multiple Sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

## Paola Panina

Università Vita-Salute San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Dipartimento di Neuroscienze, Milano

### **Gli acidi grassi a catena corta nella sclerosi multipla: modulatori endogeni di staminalità neuronale e neuroinfiammazione**

Short-chain fatty acids in multiple sclerosis: endogenous modulators of neural stemness and neuroinflammation

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 245.000 - 2 anni / years

## Ermanna Turano

Università degli Studi di Verona, Neuroscienze, Biomedicina e Scienze Motorie, Verona

### **Somministrazione intranasale di vescicole extracellulari da cellule staminali adipose nel modello sperimentale di encefalomielite autoimmune sperimentale: una nuova strategia terapeutica per la SM**

Intranasal administration of extracellular vesicles derived from adipose mesenchymal stem cells (ASC-EVs) in experimental autoimmune encephalomyelitis: a novel therapeutic strategy for MS

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 29.925 - 1 anno / year

## Ildiko Szabo

Università degli Studi di Padova, Biologia, Padova

### **L'eliminazione selettiva delle cellule T della memoria blocca la progressione dell'EAE : dalle evidenze sperimentali alla possibile applicazione per la sclerosi multipla**

Selective elimination of effector memory T cells halts EAE progression: from experimental evidence to possible application in Multiple Sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 100.000 - 2 anni / years

## Laura Mori

Università degli Studi di Genova, DINOGMI, Ospedale Policlinico San Martino IRCCS, Genova

**Impatto della tDCS anodica e della realtà virtuale nei disturbi cognitivi in pazienti affetti da Sclerosi Multipla: studio in doppio cieco, randomizzato, prospettico, controllato**

Impact of anodal tDCS and virtual reality on cognitive dysfunction in patients with Multiple Sclerosis: a double blind, randomized, prospective, controlled study

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 100.000 - 2 anni / years

## NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

### Nicola Smania

Università degli Studi di Verona, Neuroscienze, Biomedicina e Scienze Motorie, Sezione di Medicina Fisica e Riabilitativa, Verona

**Trattamento singolo versus trattamento combinato cognitivo e motorio nella riabilitazione del paziente con sclerosi multipla**

Isolated versus combined cognitive and motor high-tech rehabilitation in patients with multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 85.434 - 2 anni / years

### Marta Bassi

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche Luigi Sacco, Milano

**Sostenere la salute mentale nella quotidianità dopo la diagnosi di sclerosi multipla: il ruolo della flow experience e della mindfulness**

Supporting mental health in daily life after the diagnosis of multiple sclerosis: the role of flow experience and mindfulness

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 97.654 - 2 anni / years

### Rosalba Rosato

Università degli Studi di Torino, Psicologia, Torino

**Identificazione di domini di qualità di vita associata alla salute per lo sviluppo di una banca item per il testing adattivo computerizzato multidimensionale nella sclerosi multipla**

Identifying health-related quality of life domains to develop an item bank for multidimensional computerized adaptive testing in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 29.977 - 1 anno / year

## Monica Falautano

IRCCS Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, Neurologia e riabilitazione neurologica, Milano

**La Batteria Breve e Ripetibile di test Neuropsicologici (BBR-N-Batteria di Rao): dati normativi nella popolazione italiana con età maggiore a 51 anni**

The Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests (BRB-N- Rao's Battery): normative values in an Italian population over 51 years old

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 87.500 - 2 anni / years

## Maura Casadio

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

**Valutazione e esercizio personalizzato delle capacità di guida in persone con sclerosi multipla**

Assessment and personalized training of driving skills in people with multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

## Sara Isernia

Fondazione Don Carlo Gnocchi, IRCCS Santa Maria Nascente, CADiTeR, Milano

**L'utilizzo del metodo Lee Silvermann Voice Treatment (LSVT)-Loud in teleriabilitazione: studio pilota sulla fattibilità e gli effetti del trattamento sull'intensità vocale e sulla qualità della voce**

A feasibility pilot study on Lee Silvermann Voice Treatment (LSVT)-Loud on voice intensity and voice use in daily living in people with multiple sclerosis: a telerehabilitation approach

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 29.925 - 1 anno / year

## Marco Panasci

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

**Studio sugli effetti di un allenamento intervallato ad alta intensità 30s-30s sulle risposte cardiorespiratorie e sulla prestazione fisica in persone con sclerosi multipla con disabilità minima**

Investigation of the effects of 30s-30s HIIT protocol using two different ergometers on cardiorespiratory responses and physical function in person with MS with minimal disability.

Borsa di Ricerca / Research Fellowship

€ 54.000 - 2 anni / years

## Elisa Gervasoni

Fondazione Don Carlo Gnocchi, IRCCS Santa Maria Nascente,  
Neurologia, Milano

### **Valutazione dell'impatto dell'affaticabilità sperimentalmente indotta sulle funzioni motorie e cognitive. Effetti di un training ad alta intensità sulle funzioni motorie e cognitive: uno studio pilota**

Evaluation of the impact of experimentally induced  
fatigability on motor and cognitive functions. Effect  
of high intensity training on motor and cognitive  
functions: a pilot randomized controlled trial

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 163.800 - 2 anni / years

## Davide Cattaneo

Università degli Studi di Milano, Dipartimento  
di Fisiopatologia e Trapianti, Milano

### **Studio dell'attività corticale durante esercizi orientati al compito: i principi attivi della riabilitazione motoria**

Unraveling active ingredients of neurorehabilitation:  
investigating cortical activity during task-oriented  
exercises

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 233.415 - 2 anni / years

## Alessio Avenanti

Alma Mater Studiorum Università degli Studi di Bologna,  
Psicologia, Cesena

### **Tracciare le interazioni causali tra aree premotorie e motorie nella Sclerosi Multipla**

Tracking causal interactions between premotor  
and motor areas in Multiple Sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project

€ 30.000 - 1 anno / year

# Progetti di ricerca e borse di studio finanziati da FISM 2021

## FISM funded research projects and fellowships 2021

### COVID-19 E SM / COVID-19 AND MS

#### Marco Salvetti

Sapienza Università di Roma,  
Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale  
e Organi di Senso, Roma

#### **SARS-CoV-2 e sclerosi multipla: l'interazione è iniziata? Studio sull'impatto dell'infezione e della vaccinazione sullo sviluppo di sclerosi multipla**

SARS-CoV-2 and multiple sclerosis: has the interplay started? A study on the impact of infection and vaccine on the development of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 559.500 - 3 anni / years

#### Francesco Cucca

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

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 350.000 - 2 anni / years

#### Andrea Cossarizza

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

#### **Ruolo e la funzionalità delle cellule T specifiche per SARS-CoV-2 in pazienti con sclerosi multipla vaccinati**

Unravelling the role and functionality of T cells in treated multiple sclerosis SARS-CoV-2 vaccinated patients

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 225.000 - 2 anni / years

#### Massimo Filippo

Fondazione Centro San Raffaele,  
Unità di Neurologia e Unità di Ricerca in Neuroimaging,  
Milano

#### **COVID-19 nelle persone con sclerosi multipla: impatto su attività delle malattia, progressione, profili neuropsichiatrici e aspetti immunologici. Lo studio DISCERNING**

COVID-19 in people with multiple SCLEROSIS: impact on disease activity, progression, Neuropsychiatric profile and Immunological features. The DISCERNING study.

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 1 anno / year



**COMITATO SCIENTIFICO FISM  
2022, 2021**

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE  
2022, 2021

---

# 2022 Biomedical Research FISM Scientific Committee

---

## **Maria Pia Abbracchio**

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

## **Benedetta Bodini**

*Institut du cerveau et de la moelle épinière (ICM), Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France*

## **Gabriela Constantin**

*Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia*

## **Francesco Cucca**

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

## **Massimiliano Di Filippo**

*Centro Malattie Demyelinizzanti e Laboratori di Neurologia Sperimentale, Clinica Neurologica, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia*

## **Roberto Furlan**

*Unità di Neuroimmunologia Clinica, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia*

## **Matilde Inglese**

*DINOGLMI, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia  
Mount Sinai School of Medicine – New York, USA*

## **Giuseppe Matarese**

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

## **Paolo Muraro**

*Department of Brain Sciences, Imperial College London, London, UK*

## **Stefano Pluchino**

*Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK*

## **Stefano Previtali**

*Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

## **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, Italia*

## **Antonio Scalfari**

*Imperial College London, London, UK*

## **Claudia Verderio**

*CNR Istituto di Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano, Italia*

# 2022 Social & Behavioural Science Research FISM Scientific Committee

---

## **Roberto Bergamaschi**

*Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C Mondino, IRCCS, Pavia, Italia*

## **Marco Bove**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova, Genova, Italia*

## **Roshan das Nair**

*University of Nottingham, Nottingham, UK  
SINTEF Digital, Health Services Research, Trondheim, Norway*

## **Monica Falautano**

*Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

## **Luca Prosperini**

*Dipartimento Neuroscienze, U.O.C. Neurologia e Neurofisiopatologia, Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma, Italia*

## **Jaume Sastre-Garriga**

*Neurology-Neuroimmunology Department, Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat), Barcelona, Spain*

## **Anders Guldhammer Skjerbæk**

*Development Manager Msc, Physiotherapist, MS Hospitals in Denmark*

# FISM "COVID-19 and MS" ad hoc commission, 2021

---

## **Abrignani Sergio**

*Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità  
Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

## **Battaglia Mario Alberto**

*Presidente Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova, Italia*

## **Castelli Francesco**

*Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali,  
ASST-Spedali Civili di Brescia, Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italia*

## **Falautano Monica**

*Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia*

## **Furlan Roberto**

*Unità di Neuroimmunologia Clinica, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia*

## **Gasperini Claudio**

*Direttore UOC di Neurologia e Neurofisiopatologia - Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma, Italia*

## **Matarese Giuseppe**

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

## **Mattoscio Miriam**

*Imperial College London, London UK*

## **Sastre-Garriga Jaume**

*Neurology-Neuroimmunology Department, Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat), Barcelona, Spain*

## **Vineis Paolo**

*MRC Centre for Environment and Health, School of Public Health, Imperial College London, London  
Visiting Professor, Italian Institute of Technology, Genova, Italia*

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) e patologie correlate, attraverso una prospettiva d'insieme che abbraccia il tema dei diritti, i servizi sanitari e socio-sanitari, la promozione, l'indirizzo e il finanziamento della ricerca scientifica. Le patologie correlate includono lo spettro delle malattie della neuromielite ottica (NMOSD) e MOGAD, che necessitano di un'attenzione simile alla SM.

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 o patologie correlate 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.

*The Italian Multiple Sclerosis Society (AISM) is the only organization in Italy that deals with every aspect of multiple sclerosis (MS) and related pathologies with a structured and organic approach. AISM has an all-round perspective that covers points such as advocating for the rights of people with MS, health and social services, promotion, orientation and funding scientific research. The pathologies linked to MS include Neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) and MOGAD, which require similar attention from health and social services as MS.*

*Thanks to its Multiple Sclerosis Research Foundation (FISM), established in 1998, AISM promotes research to accelerate the discovery of effective therapies and treatments that slow the progression of the disease and to ensure that one day a definitive cure can be found.*

*Over the past 20 years, the scenario for people dealing with MS everyday has undergone radical change, thanks to the positive impact of new drugs and therapeutic advances. AISM has made a significant contribution to achieving these results thanks to our ability to orientate scientific research towards excellence and innovation on a national and international level.*

**Note / Notes**



A series of 20 horizontal grey lines spaced evenly down the page, providing a template for writing notes.







Numero Verde AISM

**800.80.30.28**

**[www.aism.it](http://www.aism.it)**