DOTTORATO IN NEUROSCIENZE

CLINICO-SPERIMENTALI E PSICHIATRIA

Coordinatore: Prof. M. Salvetti

Tesi di dottorato

L'integrazione sensori-motoria nella Sclerosi Multipla: studio di correlazione dei parametri neurofisiologici, clinici e di neuroimaging in una coorte di pazienti affetti da forma recidivante-remittente

Relatore

Ch.mo Prof. A. Berardelli

Candidato

Dott. Antonio Cortese

Correlatore

Prof. E. Millefiorini

Anno Accademico 2016-2017

- ***Introduzione***

  Capitolo 1 – *La Sclerosi Multipla* ..... *pag. 2*

  - *Epidemiologia* ..... *pag. 2*
  - *Eziopatogenesi* ..... *pag. 4*
  - *Neuropatologia* ..... *pag. 14*
  - *Fisiopatologia* ..... *pag. 19*
  - *Sintomatologia* ..... *pag. 20*
  - *Decorso* ..... *pag. 27*
  - *Scale di valutazione clinica* ..... *pag. 29*
  - *Diagnosi* ..... *pag. 33*
  - *Prognosi* ..... *pag. 40*
  - *Terapia* ..... *pag. 42*

  Capitolo 2 – *La risonanza magnetica nella Sclerosi Multipla* ..... *pag. 64*

  - *Ruolo delle tecniche convenzionali nella diagnosi e nel monitoraggio* ..... *pag. 65*
  - *Tecniche avanzate di risonanza magnetica (Spettroscopia, Diffusione, Magnetization transfer Imaging, Diffusion Tensor Imaging, lesioni corticali)* ..... *pag. 80*

  Capitolo 3 – *La discriminazione temporale somatosensoriale: STD e STDT* ..... *pag. 88*

  - *Basi anatomiche della STDT* ..... *pag. 88*
  - *STDT e movimento* ..... *pag. 90*
  - *STDT e Sclerosi Multipla* ..... *pag. 92*
- ***Obiettivi*** ..... *pag. 94*
- ***Materiali e metodi*** ..... *pag. 95*
  - *Popolazione in esame* ..... *pag. 95*
  - *Parametri clinici e valutazione neuropsicologica* ..... *pag. 96*
  - *Protocollo neurofisiologico* ..... *pag. 96*
  - *Protocollo neuroradiologico* ..... *pag. 101*
  - *Analisi statistica* ..... *pag. 103*
- ***Risultati*** ..... *pag. 105*
- ***Discussione*** ..... *pag. 111*
- ***Bibliografia*** ..... *pag. 116*

Introduzione

Capitolo 1 - La Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria del Sistema Nervoso Centrale (SNC), a verosimile patogenesi autoimmune[1,2].

Si caratterizza per la presenza di multiple aree di demielinizzazione sparse nel SNC, con predilezione per le vie lunghe e la sostanza bianca periventricolare, midollo spinale, nervi ottici, tronco encefalico e cervelletto.

Anche se viene descritta come una patologia che colpisce classicamente la mielina, è ormai noto da tempo il coinvolgimento oltre che della sostanza bianca (SB) anche della sostanza grigia (SG).

Il decorso è variabile e imprevedibile ma più frequentemente la perdita della guaina mielinica e la degenerazione assonale determinano la comparsa di ricorrenti episodi di sofferenza focale del SNC, i quali inizialmente tendono alla regressione spontanea, ma che con il passare del tempo causano deficit neurologici permanenti. Inoltre non raramente dopo anni dall'esordio, la malattia assume decorso progressivo con o senza esacerbazioni.

Epidemiologia

Dopo i traumi cranici, la SM è la patologia più frequentemente responsabile di disabilità neurologica nei giovani-adulti.

L'età d'esordio della malattia è compresa tra i 20 ed i 40 anni con un picco d'incidenza intorno ai 30 anni, tuttavia può insorgere anche in bambini o adolescenti (3-5%) ed in persone di età superiore ai 50 anni (9%).

La frequenza della SM è maggiore nel sesso femminile che in quello maschile; negli adulti il rapporto tra uomini e donne è di 1:2 (variabile da 1,9 a 3,1), mentre nei bambini e negli adolescenti la prevalenza nel sesso femminile è ancora più marcata (circa 1:5-10).

La malattia colpisce circa 2.5 milioni di persone in tutto il mondo con una prevalenza nel Nord Europa intorno a 100 casi/100.000 abitanti. Oggi è ormai

risaputo che l'Italia, una volta considerato un paese a basso rischio per SM rispetto al Nord Europa, è in effetti al contrario un'area ad alto di rischio, con tassi di prevalenza di circa 50-80 casi/100.000 abitanti.

Numerosi studi hanno dimostrato lo stretto rapporto della SM con la latitudine: la malattia si presenta più frequentemente in Nord America, Sud-est dell'Australia e della Nuova Zelanda e in Sud Africa, essendo relativamente rara, al contrario, ai tropici[3].

Questa distribuzione indica un aumento progressivo di incidenza della SM con l'aumentare della latitudine, diventando, la malattia, molto comune fra il 50° e il 60° parallelo per poi diminuire nuovamente di frequenza[4]. La conferma che l'incidenza della SM è legata a particolari fattori ambientali è emersa dall'osservazione che le popolazioni migranti tendono a conservare il rischio della zona d'origine quando la migrazione avviene dopo i quindici anni, mentre acquistano il rischio del nuovo paese quando la migrazione avviene prima dei quindici anni[5].

Inoltre diversi studi hanno altresì dimostrato come esista un'associazione tra la distribuzione geografica e fattori genetici della popolazione. In Sardegna, ad esempio, un'alta prevalenza di SM (superiore ai 100 casi/100.000 abitanti) si associa ad un particolare aplotipo del sistema maggiore di istocompatibilità (DR4).

L'incidenza della SM in Italia è di circa 3-8 casi su 100.000 abitanti l'anno, con marcate variazioni regionali; in particolare in Sicilia ed in Sardegna l'incidenza raggiunge i 45 casi/100.000 abitanti[6].

Eziopatogenesi

L'eziologia della SM è ancora oggi sconosciuta, tuttavia l'ipotesi più accreditata suggerisce l'origine autoimmunitaria della malattia, in cui giocano un ruolo fondamentale tre fattori: *genetico, ambientale ed immunologico*.

Fattore genetico

L'influenza genetica sulla SM è dimostrata dalla già citata alta prevalenza della malattia in Sardegna, circa 144 casi su 100000 abitanti[7]; all'opposto la SM è decisamente meno frequente in Corsica, circa 50 casi su 100000[8]; se da un lato tale differenza non è spiegabile in base a fattori ambientali, al contrario un contributo importante del fattore genetico è ipotizzabile sulla base della grande distanza genetica tra i sardi ed il resto dell'Europa[3].

Attualmente è quindi ben definita l'esistenza di fattori ereditari che incidono sullo sviluppo della SM: circa il 15% dei pazienti affetti ha un parente colpito da SM, con il maggior rischio di ricorrenza (3.1%) osservato nei fratelli; la percentuale di concordanza nelle coppie di gemelli omozigoti è significativamente elevata (20.1%), mentre nelle coppie di gemelli dizigoti è simile a quella esistente tra fratelli non gemelli. È interessante notare che la concordanza tra i gemelli omozigoti femmine sia più alta rispetto a quella tra i maschi, rispettivamente 34% e 6.5%. Inoltre la concordanza di malattia con i cugini materni è più alta rispetto a quella con i cugini paterni, rispettivamente 1.8% e 0.9%[3]. Si può quindi dedurre che per i parenti di primo grado esista un rischio di circa l'1-5% di contrarre la malattia, rischio significativamente più alto rispetto all'1/1000-2000 della popolazione generale. Queste osservazioni dimostrano il coinvolgimento di un fattore genetico a carattere multifattoriale (poligenico) e non a trasmissione mendeliana. Difatti è stato dimostrato che alcuni antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, sono più frequenti nei pazienti affetti da SM che nella popolazione generale, specificatamente nella popolazione caucasica, gli aplotipi DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 dell'allele DR2. In alcune popolazioni tuttavia la

malattia è associata a differenti aplotipi HLA, quali ad esempio in Sardegna, DR4 e DQW3[9]. Tuttavia, se è indubbio che tali antigeni siano correlati alla frequenza della malattia (si ritiene infatti che la presenza di uno di questi marker aumenti il rischio da 3 a 5 volte), il loro esatto ruolo non è stato ancora ben chiarito[10,11]. D'altro canto è stato recentemente individuato un ruolo protettivo per l'aplotipo HLA-A*01.01 della famiglia del complesso maggiore di istocomatibilità di classe I[12]. Inoltre, è importante sottolineare la recente dimostrazione di associazione con la SM di 95 loci e di 102 single nucleotide polymorphisms (SNPs) appartenenti a regioni geniche non-HLA, codificanti per molecole costimolatorie, di trasduzione del segnale, molecole correlate al trattamento con anticorpi monoclonali ed infine altre coinvolte nei processi di neurodegenerazione indipendente dall'infiammazione. Infine, ancora dubbia è l'influenza di geni non-HLA (ad esempio IL-1R, TNF, APO-ε, CTLA-4 e CCR-5) sul decorso e sulla severità della malattia[13].

Fattore ambientale

Studi sulla distribuzione geografica della prevalenza della SM su popolazioni con un pattern genetico costante si sono rivelati essere molto utili per identificare i fattori di rischio ambientali. Un esempio è la distribuzione della SM tra gli agricoltori francesi. Vukusic e colleghi[8] hanno individuato in Francia un duplice gradiente decrescente di prevalenza nord-sud ed est-ovest coerente con l'andamento della quantità di luce solare durante l'inverno. Sembrerebbe infatti che la scarsa esposizione al sole sia un forte fattore di rischio. Del resto, come già discusso precedentemente, è noto lo stretto rapporto della distribuzione della SM con la latitudine. Tuttavia alcuni regioni del nord Europa, in particolare la Norvegia, riportano curiosamente un basso tasso di prevalenza di malattia[14]. Una spiegazione potrebbe a questo punto risiedere nella dieta, molto ricca in queste regioni di pesce grasso, estramente ricco di vitamina D. Il principale fattore di rischio ambientale non infettivo è appunto la carenza di vitamina D, possibile

espressione di scarsa esposizione alla luce solare o di limitata assunzione alimentare[15].

Fin dalle prime descrizioni della SM, d'altronde, si è sospettato che fattori infettivi, probabilmente virali[16], potessero essere all'origine del processo infiammatorio della malattia (Charcot, 1868). Questi ultimi agirebbero attraverso diversi possibili meccanismi, quali il mimetismo molecolare, l'induzione di antigeni di istocompatibilità sulla superficie delle cellule del SNC, la stimolazione superantigenica e quella policlonale dei B-linfociti. Numerosi agenti infettivi sono stati correlati alla SM ma in nessun caso si è arrivati ad una dimostrazione conclusiva di associazione. Tra i molti agenti studiati vi è il virus del morbillo, l'Epstein Barr virus (EBV), il virus Simian 5, gli Herpes virus tra cui l'HHV-6, alcuni retrovirus compreso l'HTLV1 e recentemente la Clamydia pneumoniae.

Ad oggi comunque, l'unico agente infettivo per il quale esistono prove realmente a favore di associazione con la SM, è l'EBV. In breve, le prove a sostegno di un ruolo dell'infezione da EBV sulla patogenesi della SM riguardano (1) la sieroprevalenza: è dimostrato infatti una differenza significativa in termini di odds ratio per rischio di SM a favore dei soggetti sieropositivi[17]; (2) la dimostrazione che una storia di mononucleosi infettiva aumenti significativamente il rischio di sviluppare la SM di circa 20 volte[17]; (3) il riscontro di titoli più alti di anticorpi anti-EBV nei soggetti con SM, in particolare anticorpi anti-EBNA1[17]; (4) la dimostrazione di una espansione linfocitaria CD4+ anti-EBNA1 nettamente più significativa in pazienti con SM rispetto ai controlli[17], che addirittura sembrerebbe aver luogo anche in sottopopolazioni CD8+ di soggetti con sindrome clinicamente isolata[18].

Fattore immunologico

Sono molte le popolazioni cellulari del sistema immunitario coinvolte nella patogenesi della SM. Entrambe le componenti innata ed adattativa partecipano in un fitto interscambio di modulazione reciproca con un comune target finale

che è appunto quello del danno dell'oligodendrocita ed in seconda battuta, del neurone. Esaminiamo ora brevemente qual' è il ruolo delle varie componenti.

Risposta innata

Le popolazioni cellulari del sistema immunitario innato del SNC includono la microglia e macrofagi, le cellule dendritiche, gli astrociti, i mastociti, i linfociti NK, i linfociti NKT invarianti e i linfociti T γδ. Tutte queste popolazioni di cellule forniscono il loro contributo alla patogenesi della SM.

Le cellule dendritiche

Come microglia e macrofagi, le cellule dendritiche (DC) rappresentano la popolazione presentante l'antigene *(antigen presenting cell*-APC) a carattere "professionale"[19,20]. Sono cellule derivate dal midollo osseo in grado di infiltrare il SNC durante l'infiammazione[21,22]. Le DC, in particolare il fenotipo mieloide (classico), sono state evidenziate in aggregati perivascolari con i linfociti T CD4+[22,23]. Il loro ruolo è quello di portare ad attivazione le cellule T naive coinvolte nella genesi dell'epitopo autoimmune, fenomeno che inizia in periferia e si completa nel SNC proprio grazie al contributo delle DC in qualità di APC locali[20]. Inoltre le DC prelevate da sangue periferico hanno dimostrato di essere in grado di attivare le cellule T in modo diverso nei soggetti con SM a seconda dello stadio della malattia. Infatti le DC provenienti da pazienti recidivanti sono stati in grado di indurre sia il fenotipo Th1 che quello Th2 quando poste in coltura con cellule T naive prelevate dal sangue di cordone ombelicale, mentre le DC da pazienti progressivi sarebbero in grado di indurre solo il fenotipo Th1[24]. Le DC mieloidi sono state descritte inoltre anche come le in grado di indurre in modo molto efficiente una risposta linfocitaria Th17. Nonostante un loro principale ruolo pro-infiammatorio, esiste uno specifico sottoinsieme di cellule dendritiche, le *IL-10-producing* DC (DC-10), le quali avrebbero al contrario un ruolo tollerogenico in quanto in grado di indurre la genesi di cellule T regolatorie di tipo 1[22,23].

Gli astrociti

Il ruolo principale degli astrociti è quello di mantenere l'omeostasi del SNC, proteggendolo da qualsiasi tipo di minaccia. Sono infatti costituenti della barriera emato-encefalica (BEE), primo meccanismo di difesa di cui il nostro sistema nervoso è dotato. Inoltre sono responsabili della produzione di fattori trofici oltre che della stabilizzazione della concentrazione extracellulare di potassio e della metabolizzazione del glutammato. Oltre a questi ruoli prettamente non immunologici, d'altrone contribuiscono attivamente alla patogenesi della SM. Questo è stato da tempo dimostrato soprattutto grazie a studi basati su modelli animali di SM, in particolare l'encefalite allergica sperimentale (EAE)[25,26]. Anche se non sono APC professionali, se stimolate con IFN-γ, sono in grado di esprimere MHC di classe II[27,28] e molecole costimolatorie di interazione con cellule T, come il CD80 e il CD86[29]. In condizioni infiammatorie inoltre, quali quelle correlate ad un'increzione locale di INF-γ o TNF-α, possono favorire il reclutamento linfocitario dal sangue periferico attraverso la produzione di ICAM-1 e VCAM-1[30,31] e la produzione di diverse chemochine quali CCL2, CCL5 e CXCL10 oltre che l'attrazione di DC immature grazie alla produzione di TNF-α e IL-1β[32,33]. Per quanto riguarda l'effetto diretto sulle cellule T, diversi autori hanno dimostrano la loro capacità di attivare cellule T naive inducendo diversi fenotipi: linfociti Th1 producendo IL-12, linfociti Th2 producendo IL-4, e linfociti Th17 producendo IL-23[25]. Infine, recentemente è stato dimostrato che proprio in presenza di IL-17, gli astrociti producono una ampia varietà di chemochine tra le quali CCL2, CCL12, CXCL1 e CXCL2[34,35].

I mastociti

Come parte del sistema immune innato, i mastociti (MC) hanno un ruolo di sensore e prima reazione contro diversi tipi di minaccia. Nel sistema nervoso centrale hanno quindi una posizione perivascolare e la loro attivazione prevede il rilascio di mediatori vasoattivi in grado di favorire la permeabilizzazione della BEE. Le MC sono presenti anche nelle placche[36,37], dove contribuiscono al danno

tissutale grazie alla loro degranulazione citotossica. Nel modello di EAE le MC attivate sono state anche trovate nelle meningi, dove, rilasciando TNF-α, favoriscono il reclutamento di altre cellule immunitarie da sangue periferico[38].

Le cellule NK e NKT

Il ruolo principale delle cellule NK è di sostenere una reazione citotossica contro le cellule infette e neoplastiche. In corso di SM, queste cellule tuttavia hanno dimostrato di essere in grado di avere un effetto sia protettivo che dannoso. Ad esempio è stato evidenziato un quadro di EAE più grave nei topi NK-carenti, a causa di un aumento del profilo di risposta Th1[39] e nei topi CX3CR1-carenti, per la ridotta inibizione dei linfociti Th17 proprio da parte delle cellule NK a causa di un loro ridotto reclutamento[40]. Al contrario, altri autori hanno dimostrato un loro ruolo dannoso. Infatti in soggetti RR la loro attività funzionale è stata correlata con il rischio di attività della malattia, valutata attraverso parametri sia clinici che di imaging[41]. Tale ultima osservazione potrebbe dipendere dal fatto che le cellule NK possono essere attivate dall'IL-12 secreta dagli astrociti[42], e quindi a loro volta secernere diverse citochine tra cui l'IFN-γ in grado di promuovere la differenziazione Th1[43].

Questo duplice ruolo delle cellule NK nella SM potrebbe essere in parte, infine, dovuto alla loro interazione con le DC, per cui se da un lato possono da queste essere attivati, producendo citochine proinfiammatorie, dall'altro nella direzione opposta possono promuoverne la morte, riducendo i meccanismi di presentazione antigenica ai linfociti T[44].

È interessante notare che durante il trattamento con Daclizumab (anti-CD25), anticorpo monoclonale dimostrato essere efficace nella SM[45], vi è un drastico aumento di cellule NK circolanti T[46].

Le cellule NKT invarianti sono una sottopopolazione di cellule NK caratterizzate dall'espressione di una catena α invariante per il TCR (Vα24-Ja18). Hanno effetto tipicamente a carattere inibitorio nelle malattie autoimmunitarie[47]. Il meccanismo non è ancora completamente chiaro, ma diversi studi hanno

riportato la capacità di queste cellule di esercitare il loro effetto inibitorio sia sulle DC che sui monociti/macrofagi.

Cellule γδ-T

Le cellule γδ-T sono linfociti con TCR composti da catene invarianti gamma e delta. Come per le altre popolazioni di cellule appartenenti all'immunità innata, il loro ruolo nella patogenesi della SM è controverso e probabilmente non univoco. Esse sono presenti nelle placche[48], ed in seguito ad attivazione da parte degli astrociti[49] avrebbero un effetto citotossico sugli oligodendrociti[50]. Sono state infatti trovate aumentate nel liquor di soggetti SM con malattia in fase di attività[51], nonchè nei pazienti progressivi[52]. Al contrario però in corso di EAE sono state segnalate come cellule a carattere protettivo[53]. Probabilmente, esistono anche per le cellule γδ-T diverse sottopopolazioni in grado di esercitare effetti opposti sulla patogenesi e sul decoroso della SM, infatti recentemente è stata dimostrata l'esistenza di due popolazioni cellulari distinte, una in grado di favorire lo sviluppo di linfociti infiammatori TH17, l'altra, al contrario, con proprietà regolatorie[54].

Microglia

La microglia rappresenta la popolazione residente macrofagica del SNC. La loro funzione è quella di rilevare ogni possibile minaccia e ristabilire l'omeostasi tissutale. Esiste quindi un duplice fenotipo di questa cellula, una resisdente/inattiva ed una attiva/ripristino. Il secondo tipo è in grado di migrare attivamente seguendo gradienti chemiotattici. Da un punto di vista funzionale, esistono due fenotipi attivati[55]. Un primo tipo è indotto dal lipopolisaccaride (LPS) e da aggregati di β-amiloide e promuove la fagocitosi ed il rilascio di mediatori infiammatori. All'opposto il secondo fenotipo è indotto da citochine come IL-4 o IFN-γ e promuove l'apoptosi e la rimozione dei detriti di mielina, il rilascio di fattori anti-infiammatori, sostiene l'oligodendrogenesi, la neurogenesi e neuroprotezione[56].

Nella SM la microglia è fondamentale per il processo patogenetico. Nelle prime fasi della malattia, la microglia agisce come APC ed una volta attivata favorisce il reclutamento di cellule T naive da sangue periferico, bypassando la necessità di attivazione negli organi linfoidi periferici. Come detto precedentemente, comunque, le cellule dendritiche (DC) sembrerebbero avere maggiore importanza in questo ruolo[20], anche se la capacità della microglia di ristimolare le cellule T di memoria che invadono il SNC è essenziale per una malattia come la SM, dove la persistenza di una di attivazione immunitaria specifica supporta le caratteristiche croniche della malattia. In presenza di IFNγ e TNFα, l'espressione di molecole come ICAM-1, CD40, B7.1 e B7.2 è drammaticamente aumentata[57,58], permettendo alla microglia di interagire con le cellule T in modalità antigene-specifica. Per quanto riguarda l'interazione microglia-linfocita T, esistono prove che diverse sottopopolazioni di cellule T (come Th1 o Th2) influenzino in direzione opposta l'espressione di MHC di classe II e di molecole costimolatorie sulla microglia. Questa a sua volta grazie alla secrezione di IL- 12 può modulare la produzione di IFNγ da parte delle cellule T, il quale a sua volta stimola la microglia nella produzione di TNFα.

Immunità adattativa

Anche se ad oggi non esiste un chiaro e specifico antigene causa della SM, è ormai dimostrato il ruolo chiave del sistema immunitario adattativo nella patogenesi della malattia, che vede quindi partecipi sia le cellule T che B. Recentemente è stata riscontrata la presenza di anticorpi nel liquido cerebrospinale (LCS) diretti contro la αβ-cristallina[59], la neurofascina[60] ed alcune proteine neuronali[61]. Purtroppo, comunque, ad oggi non è chiaro quali siano i determinanti antigenici causa dell'innesco della risposta autoimmunitaria.

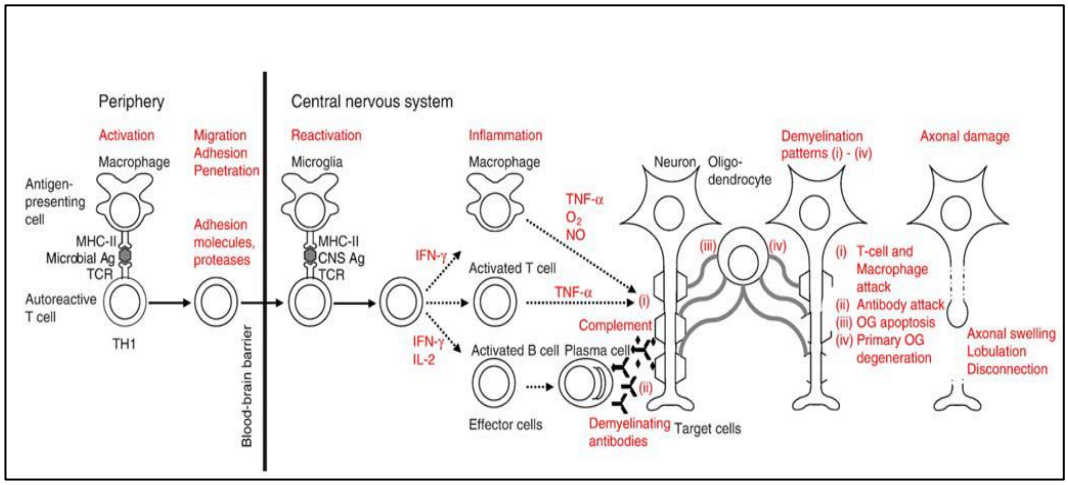
Molti delle certezze sull'immunologia della SM derivano da studi sull'encefalite allergica sperimentale (*experimental allergic encefalytis*-EAE), il modello animale della malattia. Questa è una condizione autoimmunitaria del SNC, caratterizzata da infiltrati linfo-monocitari, gliosi e in alcune specie, da demielinizzazione e

talora remielinizzazione. Tipicamente è indotta attraverso l'immunizzazione con omogenato mielinico o con singole frazioni proteiche quali la *myelin basic protein* (MBP), la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) e la *proteolipid protein* (PLP). Nell'EAE giocano un ruolo fondamentale oltre ai linfociti T e NK, cellule ad azione citotossica, anche autoanticorpi verso le proteine mieliniche, nonché fattori solubili quali citochine, radicali liberi dell'ossigeno e fattori del complemento.

Nella SM non si conosce ancora l'evento scatenante l'attivazione del processo infiammatorio, ma sembra plausibile che linfociti T CD4+ vengano attivati in periferia da un evento "trigger", verosimilmente un patogeno ubiquitario, e che, una volta attivati, siano in grado di migrare attraverso la BEE. Il passaggio della barriera è mediato dall'interazione tra recettori sulle cellule endoteliali, selectine ed integrine, ed i loro ligandi sulla superficie dei linfociti. All'interno del SNC i linfociti attivati sono in grado di interagire con le cellule presentanti l'antigene (macrofagi e microglia), riconoscendo auto-antigeni mielinici attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare tra la proteina mielinica e la proteina del patogeno. Ciò conduce alla produzione di una serie di citochine proinfiammatorie con attivazione infine dell'endotelio della BEE e conseguente reclutamento di nuovi linfociti dalla periferia, mediato da chemochine quali RANTES, MIP-α ed IP-10. Il propagarsi di tale meccanismo conduce al coinvolgimento di nuovi attori quali i linfociti T CD8+, i linfociti B, i macrofagi e la microglia in grado di mantenere e perpetuare il processo infiammatorio. L'attivazione locale di molteplici meccanismi effettori risulterà in un danno sulla guaina mielinica, sugli oligodendrociti e, in un secondo tempo, anche sui neuroni. Il processo infiammatorio vero e proprio, comincia quando, dopo il riconoscimento dell'antigene, le cellule T CD4+, polarizzate in senso TH1, ed in minor misura macrofagi e microglia, iniziano la sintesi (sotto lo stimolo dell'IL-12 prodotta dalle cellule APC) di IFNγ, TNFα, TNFβ[62]. Tale reazione infiammatoria può auto-limitarsi grazie alla produzione di citochine antinfiammatorie, come TGFβ, IL-10, IL-4, prodotte dai linfociti TH2, determinando la regressione della

sua espressione e della conseguente, eventuale, sintomatologia clinica, entro alcune settimane. Nel caso in cui tale processo infiammatorio non riesca ad autolimitarsi, si assiste all'attivazione di ulteriori cellule, che determinano un danno che va dalla distruzione della guaina mielinica alla degenerazione assonale (figura 1, box 1).

Figura 1. Ipotetico meccanismo patogenetico della SM (Fonte: Neuhaus O et al., J. Neurological Sciences 2007)[62].



Box 1. Meccanismo patogenetico della SM (Fonte: Neuhaus O et al., J. Neurological Sciences 2007).

Attraverso i loro recettori (TCR), i linfociti T pro-infiammatori sono attivati in periferia da antigeni estranei o del self (Ag), presentati sul complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) dalle cellule presentanti l'antigene (APC). Una volta attivati, i linfociti T migrano, aderiscono e penetrano la barriera ematoencefalica mediante meccanismi di adesione molecolare, proteasi e citochine. All'interno del sistema nervoso centrale (SNC), i linfociti T vengono riattivati dal MHC-II sulle APC. I linfociti T riattivati secernono citochine pro-infiammatorie, quali interferone (INF-γ) o interleuchine (IL-2) e inducono infiammazione nel SNC con conseguente attivazione di molecole effettrici su macrofagi, linfociti B e altri linfociti T. I macrofagi e i linfociti T attaccano la guaina mielinica attraverso mediatori citotossici, soprattutto il tumor necrosis factor (TNF-α), le specie radicaliche dell'ossigeno (O2) e l'ossido nitrico (NO). I linfociti B si differenziano in plasmacellule che secernono anticorpi demielinizzanti. Questi ultimi possono attivare altri macrofagi o la cascata del complemento che causa il danno mielinico.

Recentemente accanto al ben definito linfocita Th1 si è aggiunta la figura del linfocita Th17. Se nel modello animale d'altronde il ruolo proinfiammatorio di questa cellula è ben dimostrata, nell'uomo ancora il suo ruolo patologico e la sua complessa regolazione periferica sono ancora dibattuti[63]. Il linfocita Th17 produce un variegato pattern citochinico comprendente l'interleuchina-17, -6, -21, -22, -23 ed il TNF-α, che hanno ben nota funzione proinfiammatoria. Cellule Th17 autoreattive possono migrare attraverso la BEE e una volta giunte nel SNC iniziano la secrezione di citochine come IL-17 e IL-22, in grado di interrompere il legame tra le *tight junctions* endoteliali favorendo l'ulteriore danno di barriera. Inoltre sempre nel modello animale è dimostrata la capacità di queste cellule di richiamare neutrofili ad azione neurotossica. Coerentemente con queste osservazioni e la relativa vasta gamma di produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie, si pensa ad oggi che cellule Th17 possano avere un ruolo chiave nella immunopatologia della malattia.

Infine l'importanza di una risposta immunitaria mediata dai linfociti B è indicata dalla presenza di immunoglobuline IgG oligoclonali, presenti nel liquor in circa il 69% dei casi di SM[64], dalla presenza di cellule B Ig-produttrici e di plasmacellule all'interno delle placche[65,66]. Inoltre recente è la descrizione, nei cervelli di pazienti affetti da sclerosi multipla secondariamente progressiva, della formazione di follicoli intrameningei con cellule B proliferanti (strutture simili a centri germinativi) associata a grave demielinizzazione corticale, aumento del numero di lesioni corticali attive e ad un'attivazione microgliale più pronunciata con perdita assonale[67,68]. Del resto è nota l'efficacia terapeutica dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab e del suo umanizzato Ocrelizumab nei pazienti remittenti[69-71].

Neuropatologia

Le due caratteristiche patologiche essenziali della SM sono la demielinizzazione infiammatoria segmentaria e la degenerazione assonale, processi che si instaurano diffusamente in tutto il SNC e che macroscopicamente si configurano

nella comparsa delle peculiari placche multifocali all'interno della sostanza bianca degli emisferi cerebrali, del cervelletto, del tronco encefalico, del midollo spinale e del nervo ottico.

Nonostante una suddivisione in regioni d'interesse non sia in grado di descrivere pienamente il complesso spettro di processi patologici in continua evoluzione nei diversi tempi della malattia, in generale è possibile descrivere le classiche placche della sostanza bianca (*white matter lesions*-WML), le alterazioni patologiche della sostanza bianca apparentemente normale (*normal appearing white matter*-NAWM) e le lesioni corticali (*grey matter lesions*-GML).

Le placche

Macroscopicamente le WML *recenti* presentano una consistenza ridotta ed un colorito più roseo rispetto al tessuto circostante; le lesioni di *vecchia data* invece hanno una consistenza aumentata, bordi ben delimitati ed un colore grigiastro. Il corpo calloso, i nervi ottici, il tronco cerebrale (specialmente la SB attorno all'acquedotto) ed il midollo spinale (specie nel suo tratto cervicale) sono regioni costantemente interessate. In generale all'esame microscopico le *lesioni recenti* mostrano perdita di mielina, presenza di macrofagi ripieni di lipidi (*glitter cells*), infiltrato perivascolare di linfociti (sia B che T) e plasmacellule. Gli oligodendrociti nelle fasi iniziali possono proliferare nel tentativo di ricostruire la mielina, in alcuni casi con successo parziale (*placca ombra*); segno di remielinizzazione è la presenza di sottili strati di mielina e di internodi più corti rispetto alla sostanza bianca preesistente[72,73]. Al contrario, la carenza di oligodendroglia si associa al deficit nel processo di riparazione delle lesioni[74], ed in questi casi si sviluppa gliosi. Specificatamente, se la proliferazione astrocitaria inizialmente è visibile solo alla periferia delle placche, con il passare del tempo, di pari passo al danno della mielina, un denso intreccio di processi fibrillari cicatriziali si genera anche al centro della placca. Progressivamente i macrofagi carichi di detriti mielinici si dispongono a sede perivascolare ed ai margini della lesione compare un bordo

attivo ipercellulare formato da astrociti, linfociti, cellule mononucleate e macrofagi, responsabili della progressione centrifuga della lesione.

Le *lesioni croniche* sono di fatto delle cicatrici e quindi sono ipocellulari con completa perdita di oligodendroglia associata a perdita neuronale, con o senza infiltrato infiammatorio perilesionale (*croniche attive o inattive)* e con presenza di gliosi fibrillare. Il danno assonale tuttavia non è tipico solo delle placche più vecchie ma è presente anche nelle lesioni acute ed è probabilmente secondario agli stessi meccanismi infiammatori che inducono la demielinizzazione.

Come accennato, la remielinizzazione spontanea è un processo comune in corso di SM. Recenti studi hanno dimostrato che la remielinizzazione può localizzarsi a livello del margine lesionale oppure sostituire la precedente demielinizzazione sull'intera superficie della lesione, dando origine, come detto, alle cosiddette placche ombra. In caso di mancata remielinizzazione, la conseguenza è la degenerazione assonale secondaria, essendo l'integrità del rivestimento mielinico fondamentale per la vita dell'assone[75]. L'assone cronicamente demielinizzato, infatti, è destinato ad andare incontro a sofferenza, atrofia ed infine a morte e tale evento è cruciale nella comparsa della disabilità clinica permanente.

Riassumendo, quindi, proprio sulla base del grado di infiammazione, demielinizzazione, perdita assonale, remielinizzazione e gliosi, attualmente le placche sono classificabili in pre-attive, attive recenti, attive tardive, croniche attive, croniche inattive e placche ombra[76-78].

La sostanza bianca normalmente apparente

In corso di SM il processo di degenerazione assonale secondaria all'infiammazione si verifica non solo nelle placche ma anche nella NAWM[75,79].

Il grande interesse per il danno assonale diffuso è stato in gran parte alimentato dalla recente disponibilità di tecniche di risonanza magnetica (RM), che consentono di valutare *in vivo* il danno tissutale irreversibile. In effetti studi mediante RM spettroscopica hanno confermato una riduzione dell'N-acetil

aspartato (NAA), un marker di danno neurono-assonale, fin dalle fasi di esordio della malattia[80], non solo nelle lesioni della SB, ma anche al di fuori di esse nella NAWM e persino nella SG encefalica[81].

Appunto, al di fuori delle lesioni macroscopicamente visibili, la NAWM è da tempo dimostrata essere sede di importanti processi patologici, oggi correlabili agli aspetti clinici del paziente SM grazie alle più recenti tecniche di RM (vedi dopo, *Tecniche avanzate di risonanza magnetica*).

Da un punto di vista patogenetico, Howell e collaboratori[82] hanno individuato nella NAWM un quadro di diffusa e predominante attivazione microgliale con associata disgregazione dell'unità assono-gliale e successiva degenerazione assonale, tutto ciò, caratteristicamente, indipendentemente dalla presenza di infiltrazione linfocitaria e dallo sviluppo di foci di demielinizzazione. La suddetta microglia sarebbe caratterizzata da notevole dimensione cellulare, da elevata granularità, dall'espressione del CD45 (marker di attivazione classica), dalla pressocchè totale assenza del CD206 (espresso nella microglia alternativamente attivata)[83], dalla sovraespressione del CD32b (recettore a bassa affinità di tipo II-b per la regione gamma della frazione Fc delle immunoglobuline), dalla scarsa risposta al lipopolissaride (LPS) in coltura e dall'espressione di CD18 sopprimibile con stimolazione al desametasone. Questi risultati hanno permesso di caratterizzare queste cellule come microglia "immunoregolata", una popolazione cellulare parzialmente attivata con caratteristiche di "allerta", che riflette comunque un quadro di neuroinfiammazione in corso (*microglia neurotossica*).

Uno studio recente ha correlato i cambiamenti neuropatologici con quelli di imaging RM[84]. Il confronto è stato effettuato su quattro tipi di regioni di interesse di cervelli provenienti da pazienti affetti da SM secondariamente progressiva: (1) lesioni T2, (2) regioni con Magnetization Transfer Ratio (MTR) anomalo vicino alle lesioni, (3) regioni con MTR anomalo lontano dalle lesioni e (4) la NAWM, con un segnale normale sia T2 che MTR. La correlazione patologica ha individuato il segnale anomalo MTR essere associato a rigonfiamento assonale solo nella

NAWM vicino alle lesioni, viceversa però sia vicino che disante dalle lesioni, il segnale MTR anomalo è stato associato con l'attivazione microgliale.

Due studi, infine, sono stati effettuati utilizzando i microarray per esplorare la NAWM in pazienti con SM, il primo[85] ha evidenziato una sovraregolazione della trascrizione di geni neuroprotettivi coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi dopo danno cellulare ipossico; il secondo[86] ha individuato nelle lesioni e nella NAWM un'egual grado di sovraespressione di alcuni geni coinvolti nell'immunità cellulare mentre nelle sole lesioni vi era una più alta espressione dei geni per la sintesi Ig e per la differenziazione neurogliale.

In conclusione, se classicamente la SM è descritta come una patologia multifocale, a tutti gli effetti si tratta di una patologia *diffusa*, dove i processi di demielinizzazione ed assonodegenerazione sono infatti individuabili anche al di fuori della placca e probabilmente un ruolo chiave nella genesi di tali processi sarebbe da attribuire alla microglia.

Le lesioni corticali

È noto ormai da tempo, grazie a studi di istopatologia e di *neuroimaging,* che in corso di SM anche la SG è affetta da sostanziali processi patologici[87,88], in particolare a livello della giunzione cortico-sottocorticale[89,90]. Infatti, ad oggi, un numero sempre maggiore di studi riportano il coinvolgimento neocorticale, cerebellare e dell'ippocampo[91].

In generale le GML sono caratterizzate da demielinizzazione e perdita neuronale con minore presenza di cellule infiammatorie rispetto alle classiche WML, comunque presenti soprattutto nelle lesioni di nuova formazione e nelle leptomeningi.

Il pattern patologico delle GML è stato caratterizzato in base alla loro posizione anatomica[92]: (1) lesioni contigue con lesioni sottocorticali della sostanza bianca; (2) piccole lesioni all'interno della corteccia, spesso perivascolari e (3) lesioni subpiali, fino allo strato corticale III o IV. Gli stessi autori, utilizzando il sistema dei *microarrays*, hanno individuato nelle GML specifiche caratteristiche di

espressione genica dimostrative del coinvolgimento dell'infiammazione e del danno ossidativo.

Inoltre recente è la descrizione nelle meningi di pazienti affetti da SM progressiva di strutture follicolo-simili associati a diffusa attivazione microgliale, demielinizzazione corticale subpiale, neurodegenerazione e quindi prognosi peggiore[93]. Gli stessi autori ipotizzano come la causa della demielinizzazione e della neurodegenerazione corticale progressiva sia proprio l'azione di fattori solubili neurotossici provenienti da suddette strutture linfoidi meningee[93,94].

Da sottolineare, infine, come sia proprio stata la documentazione di suddette strutture simil-linfoidi a permettere di supporre come in corso di SM sia probabile il passaggio progressivo da una flogosi "periferica" ad una flogosi "compartimentalizzata", in particolare appunto nelle forme progressive[95]. Questa tipologia di infiammazione sarebbe appunto fortemente legata allo sviluppo di neurodegenerazione[96], e come discusso precedentemente per la NAWM, sarebbe anch'essa associata ad un quadro di importante attivazione microgliale[97,98].

Fisiopatologia

Nelle fibre demielinizzante la conduzione saltatoria non è più possibile e l'impulso nervoso procede con più lentezza. Il rallentamento della conduzione nella via piramidale è responsabile della fatica, costantemente presente nei malati SM, ed il blocco della conduzione nervosa della perdita di funzione.

Gli assoni demielinizzati diventano sensibili a fattori ambientali, quali l'aumento della temperatura che peggiora la conduzione nervosa, ed agli stimoli meccanici, con comparsa di potenziali d'azione improvvisi come, ad esempio, nel fenomeno di Lhermitte legato alla flessione del capo, o gli spasmi tonici secondari al movimento. La demielinizzazione può dar vita inoltre ad impulsi ectopici, all'origine del fenomeno di trasmissione efaptica tra assoni demielinizzati contigui. Tali meccanismi di conduzione anomala sono alla base di fenomeni

parossistici sentivi o motori, quali la nevralgia del trigemino, le parestesie, le contrazioni muscolari toniche prolungate.

Nelle fasi acute ed iniziali della malattia la flogosi e la demielinizzazione sono responsabili di una sofferenza assonale che trova riscontro in una perdita di funzione che può essere parzialmente recuperata con la regressione dell'infiammazione, l'utilizzo di vie di conduzione alternative ed attraverso un tentativo di remielinizzazione. A tale condizione fisiopatologica corrisponde la fase clinica di malattia caratterizzata da ricadute e remissioni. La cronicizzazione della lesione implica invece un processo gliotico cicatriziale, a cui corrisponde una marcata riduzione della componente infiammatoria, e una sofferenza duratura dell'assone cui segue un danno cellulare irreversibile. Al danno assonale e quindi alla sua degenerazione corrisponde la mancata regressione dei sintomi e la stabilizzazione del deficit neurologico ovvero la fase cronico-progressiva della malattia.

Sintomatologia

La sclerosi multipla presenta manifestazioni cliniche estremamente variabili sia nelle caratteristiche di esordio (età, sintomi, modalità), sia nelle caratteristiche di evoluzione (decorso, frequenza di ricadute, velocità di progressione). Nei casi avanzati, tuttavia, i disturbi motori, la spasticità, l'atassia, le turbe della sensibilità, i deficit visivi e le turbe sfinteriche sono pressoché costanti.

I sintomi iniziali sono quindi molto eterogenei anche se alcuni ricorrono più frequentemente poiché le aree di demielinizzazione si distribuiscono in sedi preferenziali.

Nel 90% dei casi la malattia esordisce come forma monosintomatica acuta, la cosiddetta *Clinical Isolated Syndrome* (CIS), la quale si caratterizza per la comparsa di disturbi che si manifestano e raggiungono il loro acme in poche ore o in alcuni giorni. Nella maggior parte dei casi il sintomo iniziale è una ipostenia ad uno o più arti (40% dei casi), una neurite ottica (22%), un disturbo soggettivo della sensibilità (tipo parestesie e disestesie) (21%), una mielite trasversa,

diplopia, vertigine o disturbi della minzione. I disturbi iniziali tendono generalmente a regredire dopo un periodo di tempo variabile ed in seguito possono ripresentarsi o possono comparire altri sintomi e segni di sofferenza focale.

Nel restante 10% dei casi l'esordio può essere polisintomatico e l'andamento subacuto o lentamente progressivo.

Disturbi piramidali

L'interessamento del sistema piramidale con conseguente ipostenia e spasticità, localizzata ad uno o più arti, è un evento costante e rappresenta una importante causa di disabilità.

All'esordio il coinvolgimento piramidale si può manifestare talvolta in maniera insidiosa, con una ipostenia agli arti inferiori, molto spesso solo dopo affaticamento o lunghe camminate, e tendenza al recupero dopo un periodo di tempo di riposo, altre volte in maniera subacuta con una paraparesi o emiparesi.

L'ipostenia colpisce più spesso gli arti inferiori in genere asimmetricamente, o un solo arto inferiore o un emilato corporeo; più rara è la compromissione isolata di un arto superiore e rara quella isolata di ambedue gli arti superiori.

La fatica è un sintomo molto comune (80% dei soggetti) e la maggior parte dei pazienti si lamenta di un eccessivo affaticamento anche dopo limitate e banali attività. L'obiettività neurologica mostra, oltre all'ipostenia, riflessi profondi vivaci o policinetici, riflessi patologici quali l'Hoffmann e il fenomeno di Babinski, clono del piede; i riflessi addominali sono diminuiti o aboliti, spesso precocemente. In alcuni casi la spasticità agli arti inferiori è utile per mantenere la stazione eretta e per camminare, ma in altri casi, specie quando l'arto inferiore è iperesteso e il piede flesso plantarmente, può al contrario impedire la marcia.

Disturbi della sensibilità

Sono dovuti a lesioni dei cordoni posteriori, delle vie spino-talamiche o delle zone di ingresso delle radici posteriori, e vengono descritti dai pazienti come

sensazione di “intorpidimento”, di “carne morta”, di formicolio, di fasciatura, di gonfiore, ecc. (parestesie ed ipo/anestesia). La sede dei disturbi è la più varia: spesso iniziano ad un piede, per poi interessare l’altro arto inferiore e propagarsi prossimalmente al perineo e all’addome; talvolta sono interessate una od entrambe le mani, con una sensazione come “avere i guanti”; in altri casi ancora una lesione del midollo sacrale è responsabile di ipo/anestesia perineale con associata perdita della sensazione del passaggio di urine e feci o, in caso di lesione a livello del midollo toracico, di una sensazione di “cintura” o di “corsetto che stringe” al torace.

Il dolore neuropatico ha spesso un andamento parossistico come nel caso della nevralgia trigeminale e degli spasmi tonici dolorosi notturni. In altri casi il dolore, per esempio lombare, è legato ad un’abnorme postura o ad una ipertonia della muscolatura dorso-lombare. Sensazioni dolorose di stiramento agli arti inferiori si manifestano di notte e si associano alla spasticità. Nelle fasi più avanzate residuano spesso parestesie e disestesie alle dita delle mani e dei piedi, ipoestesia distale agli arti inferiori e molto frequentemente si evidenzia una compromissione delle sensibilità profonde, ed in particolare della pallestesia agli arti inferiori.

Nervo ottico

La neurite ottica retrobulbare (NORB) rappresenta il sintomo d’esordio di SM, in età giovanile, nel 20-25% dei casi. Tale incidenza si riduce costantemente con l’età. Nella maggior parte dei casi di SM di lunga durata una compromissione del nervo ottico, anche clinicamente non manifesta, si può evidenziare con l’allungamento della latenza dei potenziali evocati visivi (PEV). La manifestazione clinica della NORB tipicamente comprende un deficit acuto o subacuto, monolaterale, della funzione visiva spesso associato a dolore sovraorbitario e retrobulbare, esacerbato dai movimenti oculari. Il calo della vista è variabile, da pochi decimi fino, raramente, alla completa cecità, e non è correggibile con lenti. All’esame del fundus oculare il disco ottico appare quasi sempre normale nella

fase acuta, mentre può assumere un aspetto pallido, specie nei settori temporali, a distanza di alcune settimane dall'esordio, anche quando il recupero è completo. Una papilla ottica pallida ed atrofica è comunque di comune riscontro nei casi avanzati di SM. All'esame clinico si possono inoltre evidenziare la presenza di discromatopsia, difetto pupillare relativo afferente (o segno di Marcus-Gunn) ed alterazioni del campo visivo.

Il difetto campimetrico più comunemente associato alla NORB è rappresentato da uno scotoma centrale (poiché viene colpita la parte centrale del nervo ottico dove decorrono le fibre di origine maculare), ma uno studio multicentrico americano, l'*Optic Neuritis Treatment Trial* (ONTT), ha mostrato come si possano riscontrare anche deficit bilaterali, scotomi paracentrali e arciformi, e perfino deficit emianoptici tipici di lesioni retrochiasmatiche[99]. Il fenomeno di Uhthoff si caratterizza per una diminuzione dell'acuità visiva con l'aumento della temperatura corporea, che segue un esercizio fisico o la comparsa di febbre, ed esprime il peggioramento della conduzione nervosa nelle fibre demielinizzante.

La storia naturale della NORB è caratterizzata da rapido deterioramento della funzione visiva che si arresta entro 10-14 giorni, seguito da un graduale e spontaneo miglioramento nelle successive 4-6 settimane. Il rischio di sviluppare una SM dopo una neurite ottica è piuttosto alto.

Lo studio di Rizzo e collaboratori riporta che, dopo 15 anni di follow-up, il 74% delle donne e il 34% degli uomini sviluppa una SM clinicamente manifesta[100]. Secondo i dati ottenuti nell'ONTT, il 60% dei pazienti con NORB che alla RM dell'encefalo presentano tre o più aree di demielinizzazione, svilupperanno entro 5 anni dall'esordio una SM clinicamente manifesta. Tuttavia, tale rischio sarebbe presente anche nel 16% dei pazienti con RM dell'encefalo negativa all'esordio.

Tronco encefalico

Più frequentemente è caratterizzato da sindromi alterne e/o disfunzione dei nervi cranici. Se sono interessate le vie lunghe, può mimare una sindrome

cerebrale, che si manifesta per lo più con emisindromi sensitive e/o motorie, più raramente con deficit quali disfasia ed emianopsia.

Una lesione del VI, del III o più raramente del IV nervo cranico può essere responsabile di diplopia, spesso a decorso favorevole. Più frequente è l'oftalmoparesi internucleare, caratterizzata da deficit dell'adduzione e nistagmo orizzontale nell'occhio abdotto, dovuta a lesione del fascicolo longitudinale mediale.

Una nevralgia trigeminale non è evento infrequente ed è causata da una lesione nella zona di ingresso del nervo trigeminale nel ponte, ma anche a placche interessanti i tratti trigeminali discendenti o il nucleo del trigemino. Ipoestesia e disestesie possono essere associate.

Una paralisi periferica del facciale e talvolta miochimie in tale territorio sono possibili e indicano l'esistenza di una lesione intratroncale. Vertigini soggettive possono comparire, così come ipoacusia, espressione di un interessamento delle vie cocleari. Il nistagmo è frequente e spesso associato a sintomi cerebellari. Nei soggetti con estese lesioni troncali e nelle fasi tardive della malattia riso e pianto spastico possono essere presenti.

Disturbi cerebellari

Compaiono nel 10% circa dei casi. Hanno una scarsa tendenza alla regressione e quando aprono la malattia hanno un cattivo significato prognostico. Essi possono presentarsi in modo sfumato e sono generalmente descritti dal paziente come senso di instabilità, di incertezza dell'equilibrio, come sensazioni di sbandamento e vertigine soggettiva. Nei casi più conclamati il quadro si presenta con atassia della deambulazione (l'andatura atasso-spastica è un sintomo pressoché costante nel corso della malattia), dismetria, tremore intenzionale, ipotonia, disartria cerebellare, parola scandita, nistagmo.

Disturbi affettivi e cognitivi

La depressione è un sintomo frequente ed ha nella maggior parte dei casi origine "secondaria", dato il profondo modificarsi della vita, la consapevolezza di essere malati, ecc.

Talora si possono rinvenire disturbi di memoria, attenzione visuo-spaziale e capacità di calcolo legati a placche a sede periventricolare e nella sostanza grigia; un vero e proprio deterioramento mentale non è frequente, salvo in alcuni casi di malattia in fase avanzata.

Disturbi sfinterici e sessuali

La minzione imperiosa è spesso sintomo precoce e talora si accompagna ad incontinenza; in altri casi è presente difficoltà ad iniziare il mitto con residuo urinario e quindi frequenti infezioni delle vie urinarie. Nei casi avanzati i disturbi della minzione sono di tipo misto. Un rallentato transito intestinale è comune e resistenti alle usuali terapie. Frequenti infine il rilievo di turbe sessuali, con diminuzione della libido o vera e propria impotenza, dovute a lesioni dei centri spinali.

"Sintomi parossistici"

Molto caratteristici, anche se non molto frequenti sono questi sintomi, che si manifestano con un esordio improvviso, ripetizione del sintomo con le stesse caratteristiche a breve distanza di tempo, spesso scatenati da movimenti o stimoli sensitivi. Fra questi il segno di Lhermitte consistente nell'improvvisa sensazione di "scossa elettrica", che si manifesta alla flessione del capo e si irradia lungo la schiena fino agli arti inferiori o più raramente agli arti superiori; la nevralgia trigeminale; le crisi di disartria e atassia parossistica, brevi attacchi della durata di 20-30 secondi, ripetentisi ogni 30-60 minuti, di disartria e disturbi di coordinazione, in genere localizzate agli arti inferiori; contrazioni toniche, con assunzione di una postura in flessione all'arto superiore ed in estensione a quello inferiore, scatenate dai movimenti, della durata di 1 o 2 minuti; dolori improvvisi

o parestesie interessanti il volto o gli arti. Tali sintomi sono in genere espressione di una lesione troncale o come nel caso del segno di Lhermitte del midollo cervicale, durano per un periodo variabile da alcuni giorni ad alcuni mesi e tendono a regredire spontaneamente o con terapia sintomatica.

Altri sintomi

Rari sono sintomi quali la narcolessia, per lesioni dell'ipotalamo o della sostanza reticolare, movimenti involontari patologici quali tremore e coreoatetosi, cefalea, crisi convulsive.

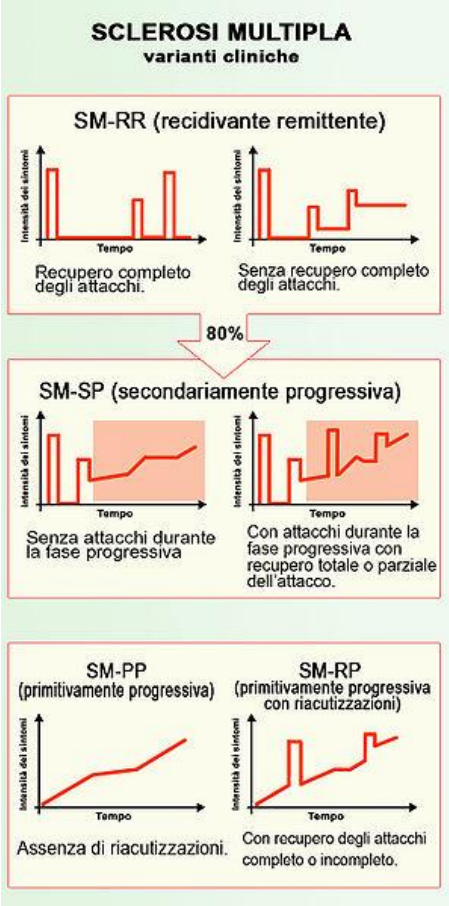
Quadri clinici particolari

La mielite trasversa è sostenuta da una lesione infiammatoria demielinizzante del midollo spinale. I sintomi d'esordio sono rappresentati da dolore locale al collo o al dorso, seguiti da un'associazione variabile di parestesie, altri disturbi sensitivi, ipostenia e disturbi sfinterici che evolvono nell'arco di alcune ore o di alcuni giorni. Le disestesie possono iniziare dai piedi e ascendere in modo simmetrico o asimmetrico. Si associano segni e sintomi piramidali bilaterali.

Sia la neurite ottica che la mielite acuta trasversa possono rappresentare l'esordio clinico di una classica SM. Tuttavia, esiste una forma di malattia demielinizzante in cui si riscontrano lesioni limitate al nervo ottico e al midollo spinale che configurano un quadro clinico combinato di neurite ottica monolaterale o bilaterale e mielite traversa: la neuromielite ottica o malattia di Devic. Il tempo che intercorre tra l'insorgenza delle lesioni nelle due diverse sedi può variare da un esordio simultaneo a un periodo di due anni[101]. Nonostante sia ancora dibattuto se la malattia di Devic debba essere considerata un'entità nosografica autonoma o una variante della SM, sono state individuate alcune peculiarità di questa forma: il riscontro alla RM di lesioni cavitarie con tumefazione del midollo, cui segue atrofia dello stesso, e l'assenza di bande oligoclonali liquorali nella maggioranza dei casi.

Decorso

Il decorso della SM può essere definito sulla base della presenza delle cosiddette ricadute e sulla base dell'eventuale presenza di un peggioramento progressivo del quadro clinico definita appunto progressione[102]. Per ricaduta clinica si intende la comparsa di uno o più sintomi nuovi, la ricomparsa di sintomi pregressi o l'aggravamento di sintomi preesistenti, per un tempo di durata superiore alle 24 ore. Sintomi che si presentano con distanza inferiore a 30 giorni uno dall'altro sono considerati parte di un unico episodio. Quando la malattia entra nella fase conclamata può essere quindi classificata in tre forme (vedi figura a latere).

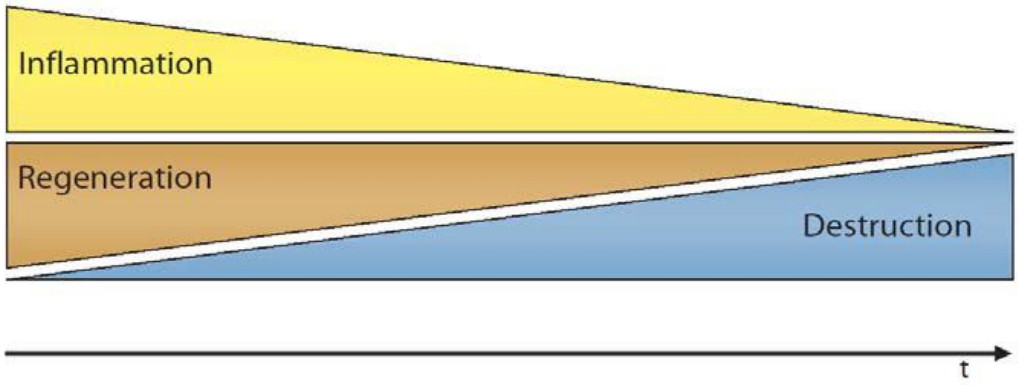


Nella maggior parte dei pazienti (80% dei casi) la malattia si presenta e assume un andamento a "ricadute e remissioni" (SMRR), con comparsa acuta o subacuta di un sintomo clinico che raggiunge il suo acme in giorni o settimane, per poi regredire parzialmente o completamente in circa 1 o 2 mesi. Il secondo episodio di deficit neurologico si può verificare entro un periodo di tempo molto variabile che generalmente si aggira attorno ai 2 anni ma che in un 10-15% dei casi può durare per molti anni, configurando una forma di malattia a decorso "benigno" con modesta o nessuna disabilità dopo 15 anni dal primo episodio. La frequenza delle ricadute è variabile, generalmente 0.5-0.7 episodi/anno. Questa fase di malattia, cosiddetta "infiammatoria" corrisponde alla formazione e risoluzione delle placche demielinizzanti all'interno del SNC, con la classica tendenza all'autorisoluzione della sintomatologia clinica che corrisponde appunto alla risoluzione della placca. Chiaramente è possibile che oltre al danno della mielina,

come già discusso, si associ il danno dell'assone con la possibilità, quindi, dell'instaurarsi di un deficit neurologico permanente.

Entro i 10 anni circa, il 50% dei casi di SMRR assumono un decorso progressivo con accumulo della disabilità, la cosiddetta forma SM "secondariamente progressiva" (SMSP). Il 90% dei pazienti raggiunge tale fase dopo 25 anni dall'esordio. In alcuni individui il decorso secondariamente progressivo si associa ancora a recidive (SMSP con ricadute). Questa fase corrisponde alla degenerazione assonale progressiva, legata alla cronica demielinizzazione del neurite (figura 2).

Figura 2. Modello di progressione di malattia (Fonte: Kieseier BC et al., J Neurol 2006)[103].



Solo nel 10-15% dei casi la malattia mostra sin dall'esordio un andamento "primariamente progressivo" (SMPP), senza mai aver presentato episodi di peggioramento clinico improvviso. L'elemento essenziale di questa forma è quindi il peggioramento clinico graduale ab initio, talora con modeste fluttuazioni, ma senza precedenti recidive.

Il decorso è generalmente a ricadute e remissioni se l'esordio è in età giovanile, mentre se la malattia inizia più tardivamente, si osserva spesso una lenta progressione dei disturbi.

Scale di valutazione clinica

Nello studio della SM, l'utilizzo di misure riproducibili (quantitative o semiquantitative) della compromissione neurologica risponde sia all'esigenza di superare la soggettività della valutazione tradizionale, sia alla necessità di valutare, con precisione, le modificazioni nel tempo del quadro clinico. Nondimeno, queste misure consentono il confronto tra gruppi di malati arruolati in studi clinici e di terapia, anche se multicentrici. La quantificazione del danno neurologico si ottiene con scale di valutazione che misurano l'*impairment*, l'invalidità e l'*handicap*.

Expanded disability status scale (EDSS)

La scala più utilizzata nella SM, è la *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) di Kurtzke[104], che quantifica il deficit neurologico a carico di diversi sistemi funzionali (piramidale, sensitivo, cerebellare, tronco-encefalico, visivo, cognitivo, sfinterico) in base al grado di disabilità. Il punteggio finale è derivato dalla combinazione dei singoli punteggi dei 7 diversi sistemi funzionali, e varia da 0 (nessuna disabilità) a 10 (morte causata da SM). La minima disabilità corrisponde a 1.0 e successivamente ogni ulteriore peggioramento del quadro clinico è descritto con un aumento del punteggio pari a 0.5 (vedi tabella a latere). Punteggio chiave nella scala è il valore 6.0 che corrisponde alla perdita dell'autonomia nella deambulazione con la necessità di appoggio unilaterale.

0.0	Normal neurologic examination
1.0	No disability, minimal signs in one FS
1.5	No disability, minimal signs in more than one FS
2.0	Minimal disability in one FS
2.5	Mild disability in one FS or minimal disability in two FS
3.0	Moderate disability in one FS, or mild disability in three or four FS. Fully ambulatory
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in one FS, and more than minimal disability in several others
4.0	Fully ambulatory without aid, self-sufficient, up and about some 12 h/day despite relatively severe disability; able to walk without aid or rest for about 500 m
4.5	Fully ambulatory without aid; up and about much of the day; able to work a full day; may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance; characterized by relatively severe disability; able to walk without aid or rest for about 300 m
5.0	Ambulatory without aid or rest for about 200 m; disability severe enough to impair full daily activities (e.g., work a full day without special provisions)
5.5	Ambulatory without aid or rest for about 100 m; disability severe enough to preclude full daily activities
6.0	Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch, brace) required to walk about 100 m with or without resting
6.5	Constant bilateral assistance (canes, crutches, braces) required to walk about 20 m without resting
7.0	Unable to walk beyond approximately 5 m even with aid; essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 h/day
7.5	Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels self but cannot carry on in standard wheelchair a full day; may require motorized wheelchair
8.0	Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but may be out of bed itself much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms
8.5	Essentially restricted to bed much of day; has some effective use of arms and retains some self-care functions
9.0	Confined to bed; can still communicate and eat
9.5	Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow
10	Death due to MS

FS: functional system; m: meters. Source: Reference 21.

Medscape Source: US Pharm © 2009 Jobson Publishing

Muliple Sclerosis Functional Composite (MSFC)

Dal momento che l'EDSS, per i livelli più elevati di disabilità, è fortemente influenzata dalla severità dei deficit alla deambulazione, più recentemente è stata introdotta nella pratica clinica una nuova scala di valutazione che, partendo dalla precedente, prende anche in considerazione i deficit motori agli arti superiori ed i deficit cognitivi[105].

Tale scala, anch'essa quindi utilizzata per la valutazione della disabilità clinica, è la *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) ed è costituita da 3 test:

1. test del percorso cronometrato (*25-foot timed walk test*, FTW), per verificare la capacità di deambulazione. Prevede la misurazione del tempo (secondi) impiegato dal paziente nel percorrere una distanza di 7.62 metri; durante il test il paziente può utilizzare l'ausilio per la deambulazione di cui si serve normalmente;
2. test dei nove pioli (*9 hole peg test*, 9-HPT) per la misurazione dell'impairment agli arti superiori. Il test consiste nell'infilare il più velocemente possibile i pioli in una tavoletta con altrettanti fori e di estrarli subito dopo (secondi);
3. test di addizione numerica (*3 second version of paced auditory serial addition test,* PASAT-3); in questo test vengono esaminate l'attenzione e la capacità di concentrazione. Da un nastro registrato vengono letti dei numeri a intervalli di 3 secondi. Il paziente deve fare a mente la somma degli ultimi due numeri nominati e pronunciare ad alta voce il risultato. L'operatore annoterà il numero di risposte esatte (valore assoluto numero risposte esatte).

In ambito di ricerca, allo scopo di stardardizzare i punteggi MSFC, i risultati vengono rielaborati in modo da ottenere dei valori normalizzati delle singole prove (z-FTW, z-9-HPT, z-PASAT); infine questi ultimi sono combinati in uno score globale di disabilità (z-MSFC)[106]. Nello specifico:

-z-FTW: la prova viene eseguita due volte e si definisce la media dei due valori. A questo punto lo z-FTW viene generato come (FTW-MeanFTW)/DsFTW, dove FTW è il valore medio delle due prove in secondi, MeanFTW corrisponde al valore medio in secondi della popolazione in esame (qualora venga esaminato un

singolo paziente il valori standardizzato di riferimento è 9.5353) e DsFTW è la deviazione standard dei valori della popolazione in esame (come sopra il valore 11.4058 è il valore standardiazzato);

-z-9-HPT: la prova viene eseguita due volte per ogni mano e si definisce il valore medio per ogni arto. A questo punto si calcola il reciproco dei due valori medi (mano destra e mano sinistra) e se ne definisce la media. Infine lo z score è definito come (Combined9HPT-Mean9HPT)/Ds9HPT dove Combined9HPT è appunto il valore medio dei reciproci delle medie delle due prove per ogni mano, Mean9HPT è il valore medio dei suddetti nella popolazione in esame (valore standardizzato 0.0439) e Ds9HPT è il valore della deviazione standard (valore standardizzato 0.0101);

-z-PASAT: il valore dello z-score in questo caso è calcolato, essendo solo una la prova, come (PASAT-MeanPASAT)/DsPASAT dove PASAT è il valore del paziente, MeanPASAT è il valore medio della popolazione (valore standardizzato 45.0311) e DsPASAT è la deviazione standard della popolazione in esame (valore standardizzato 12.0771);

-z-MSFC: a questo punto il valore combinato è calcolato facendo la media dei suddetti 3 valori, cambiando però di segno al punteggio z-FTW. Infatti se ad un z-PASAT più alto corrisponde una migliore prestazione cognitiva, al contrario un maggiore numero di secondi al 9-HPT o al 25-FTW corrisponde una maggiore disabilità. Pertanto, se nel caso del 9-HPT il problema è risolto utilizzando i reciproci dei valori base, nel caso del 25-FTW è necessario cambiare segno allo score ottenuto. Quindi, in conclusione, ad un punteggio z-MSFC alto corrispondono migliori prestazioni neurologiche, viceversa più basso è il valore dello score, maggiore è la disabilità neurologica del paziente.

Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS)

Questo tipo di scala[107] nasce dalla importante necessità, a scopi prognostici e terapeutici, di attribuire un punteggio di gravità alla tipologia di SM del paziente, sulla base del grado di disabilità accumulato in un determinato numero di anni

(*disease progression rate*). Il calcolo del punteggio è semplice ed appunto la definizione della scala non ha, al contrario dello MSFC o dell'EDSS il valore di definire le caratteristiche cliniche del paziente nel tempo allo scopo di monitorarlo, ma di definire che "tipo" di SM ha il paziente, se quindi una forma più o meno grave. Il vantaggio di questo punteggio è quindi quello di utilizzare un'unica valutazione clinica del paziente e di definire quindi la tipologia di SM già al momento della prima visita. Come mostrato nella tabella che segue, il punteggio si calcola in base all'EDSS ed al numero di anni trascorsi dall'esordio della patologia. Chiaramente quindi ad EDSS più alti e ad un numero basso di anni per il raggiungimento di suddetto punteggio, corrisponderanno punteggi MSSS più alti, indicatori di maggiore rapidità della patologia in termini di accumulo della disabilità. Da notare che il punteggio MSSS non può essere calcolato per anni di malattia inferiori ad 1.

	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	EDSS
0	0.89	2.94	4.79	6.51	7.76	8.25	8.73	9.18	9.44	9.54	9.62	9.78	9.90	9.94	9.95	9.95	9.99	10.00	10.00	
1	0.64	2.34	4.12	5.75	7.04	7.76	8.38	8.91	9.23	9.42	9.57	9.73	9.88	9.93	9.95	9.98	9.99	9.99	10.00	
2	0.53	1.99	3.65	5.25	6.47	7.21	7.90	8.47	8.83	9.06	9.26	9.50	9.75	9.86	9.93	9.97	9.98	10.00	10.00	
3	0.45	1.73	3.28	4.79	5.98	6.80	7.55	8.14	8.55	8.82	9.05	9.34	9.63	9.78	9.87	9.92	9.97	9.98	9.99	
4	0.33	1.40	2.81	4.23	5.36	6.19	6.95	7.61	8.06	8.37	8.66	9.04	9.45	9.68	9.81	9.88	9.95	9.98	9.99	
5	0.29	1.24	2.54	3.85	4.88	5.73	6.53	7.21	7.69	8.02	8.32	8.80	9.31	9.60	9.77	9.87	9.94	9.97	9.99	
6	0.24	1.10	2.30	3.51	4.51	5.36	6.13	6.79	7.27	7.61	7.95	8.49	9.09	9.46	9.70	9.82	9.92	9.97	9.99	
7	0.23	1.02	2.08	3.14	4.08	4.91	5.70	6.42	6.93	7.29	7.64	8.25	8.93	9.34	9.60	9.76	9.89	9.95	9.99	
8	0.20	0.92	1.90	2.88	3.74	4.48	5.27	6.03	6.54	6.90	7.29	7.96	8.72	9.22	9.55	9.74	9.88	9.95	9.99	
9	0.20	0.86	1.72	2.60	3.38	4.09	4.85	5.59	6.09	6.48	6.90	7.66	8.54	9.09	9.46	9.70	9.86	9.94	9.99	
10	0.19	0.77	1.53	2.34	3.09	3.77	4.51	5.24	5.74	6.12	6.58	7.40	8.32	8.93	9.34	9.61	9.83	9.93	9.99	
11	0.17	0.70	1.38	2.11	2.81	3.42	4.13	4.89	5.40	5.82	6.32	7.18	8.15	8.77	9.22	9.51	9.77	9.91	9.98	
12	0.15	0.64	1.29	1.99	2.65	3.25	3.92	4.63	5.15	5.56	6.06	6.95	7.95	8.63	9.13	9.43	9.72	9.89	9.97	
13	0.14	0.58	1.17	1.83	2.48	3.08	3.72	4.43	4.97	5.38	5.86	6.77	7.84	8.55	9.01	9.34	9.67	9.86	9.96	
14	0.11	0.51	1.07	1.75	2.39	2.96	3.61	4.36	4.92	5.32	5.77	6.62	7.64	8.36	8.84	9.20	9.58	9.82	9.95	
15	0.10	0.46	0.99	1.64	2.25	2.83	3.46	4.21	4.78	5.18	5.58	6.40	7.47	8.20	8.70	9.12	9.53	9.79	9.95	
16	0.09	0.38	0.86	1.42	1.98	2.56	3.20	3.93	4.50	4.87	5.23	6.08	7.24	8.03	8.55	9.05	9.50	9.76	9.94	
17	0.06	0.31	0.76	1.28	1.77	2.31	2.99	3.74	4.28	4.65	5.01	5.85	7.03	7.84	8.39	9.00	9.52	9.79	9.96	
18	0.04	0.24	0.63	1.10	1.54	2.08	2.70	3.36	3.89	4.26	4.60	5.47	6.74	7.63	8.27	8.95	9.49	9.77	9.96	
19	0.05	0.26	0.60	0.99	1.38	1.89	2.49	3.15	3.67	4.06	4.41	5.35	6.68	7.60	8.29	9.01	9.57	9.81	9.97	
20	0.05	0.25	0.59	0.96	1.31	1.73	2.31	2.96	3.45	3.86	4.23	5.15	6.51	7.51	8.25	8.99	9.57	9.80	9.95	
21	0.05	0.29	0.64	1.02	1.40	1.79	2.34	2.95	3.40	3.79	4.16	5.08	6.39	7.40	8.17	8.92	9.52	9.79	9.96	
22	0.04	0.23	0.55	0.92	1.31	1.69	2.21	2.81	3.26	3.66	4.04	4.99	6.35	7.39	8.18	8.89	9.45	9.74	9.95	
23	0.05	0.28	0.61	0.95	1.29	1.67	2.20	2.81	3.24	3.69	4.16	5.13	6.44	7.47	8.24	8.90	9.45	9.76	9.95	
24	0.05	0.25	0.55	0.91	1.29	1.65	2.14	2.73	3.14	3.54	4.01	5.01	6.32	7.37	8.15	8.83	9.41	9.75	9.96	
25	0.05	0.24	0.50	0.80	1.18	1.58	2.05	2.56	2.90	3.28	3.81	4.92	6.28	7.31	8.12	8.80	9.39	9.77	9.98	
26	0.06	0.22	0.49	0.81	1.18	1.57	2.05	2.59	2.96	3.35	3.87	4.95	6.32	7.41	8.22	8.89	9.48	9.80	9.96	
27	0.06	0.24	0.49	0.77	1.13	1.55	2.02	2.53	2.85	3.21	3.74	4.80	6.20	7.33	8.17	8.92	9.56	9.85	9.98	
28	0.05	0.18	0.40	0.71	1.13	1.50	1.87	2.40	2.79	3.07	3.48	4.56	6.00	7.10	7.95	8.79	9.48	9.81	9.98	
29	0.04	0.20	0.47	0.77	1.15	1.48	1.79	2.30	2.75	3.08	3.47	4.40	5.70	6.78	7.68	8.64	9.40	9.76	9.96	
30	0.03	0.16	0.44	0.78	1.14	1.43	1.70	2.27	2.81	3.15	3.48	4.29	5.50	6.57	7.46	8.43	9.27	9.67	9.92	
Years																				

Diagnosi

La diagnosi di SM rimane ancora oggi sostanzialmente clinica e si basa sulla dimostrazione della *disseminazione spaziale e temporale* delle lesioni a livello del SNC; tuttavia i criteri diagnostici che sono stati formulati negli anni da diversi autori o gruppi di studio hanno considerato l'insieme dei reperti clinici, neurofisiologici, liquorali e, oggi, soprattutto di RM.

I criteri diagnostici di Schumacher del 1965, puramente clinici, classificavano come SM clinicamente definita quella forma di malattia che soddisfi 5 o 6 (sempre includendo l'ultimo) dei seguenti criteri: 1) età all'esordio compresa tra 10 e 50 anni, 2) presenza di segni neurologici obiettivabili, 3) sintomi e segni neurologici indicativi di malattia della sostanza bianca del SNC, 4) due o più lesioni anatomicamente distinte nel SNC all'esame clinico o nella storia del paziente, 5) due o più episodi distanti almeno un mese e durati più di 24 ore o peggioramento di segni e sintomi per almeno sei mesi nella forma progressiva, 6) assenza di spiegazioni cliniche alternative.

I criteri diagnostici formulati dal comitato coordinato da Poser nel 1983[108] introdussero nella diagnosi le indagini di laboratorio, come ausilio alla clinica.

Nel 2001 il Comitato Internazionale per la diagnosi di Sclerosi Multipla ha introdotto nuovi criteri diagnostici, che sono diventati noti come "criteri di McDonald", i quali, rispetto ai precedenti, danno notevole importanza alla RM, stabilendo che questa può essere utilizzata non solo per dimostrare la disseminazione spaziale e temporale della malattia, ma anche per evidenziare il danno cerebrale clinicamente silente[109].

Successivamente nel 2005, Polman e collaboratori hanno definito dei nuovi criteri diagnostici apportando alcune revisioni ai criteri di McDonald circa il concetto di disseminazione temporale e la diagnosi di SMPP[110]. Se i criteri indicati sono confermati, la diagnosi è di Sclerosi Multipla; se i criteri non sono completamente soddisfatti, la diagnosi è quella di "possibile Sclerosi Multipla"; se i criteri sono pienamente indagati e non soddisfatti, la diagnosi è di "non Sclerosi Multipla".

Tali criteri sono qui in seguito riportati.

Tabella 1. Criteri di Polman 2005 per la diagnosi di SM.

Presentazione clinica	*Dati aggiuntivi necessari per diagnosi di SM*
2 o più attacchi; evidenza clinica obiettiva di 2 o più lesioni.	Nessuno(a).
2 o più attacchi; evidenza clinica obiettiva di 1 lesione.	Disseminazione nello spazio, dimostrata da RM(b) o 2 o più lesioni compatibili con SM dimostrate dalla RM più liquor positivo(c) o ulteriore attacco clinicamente indicativo di differente localizzazione di lesione.
1 attacco; evidenza clinica obiettiva di 2 o più lesioni.	Disseminazione nel tempo, dimostrata da RM(d) o secondo attacco.
1 attacco; evidenza clinica obiettiva di 1 lesione (clinically isolated syndrome-CIS; presentazione monosintomatica).	Disseminazione nello spazio, dimostrata da RM(b) o 2 o più lesioni compatibili con SM dimostrate dalla RM più liquor positivo(c) E Disseminazione nel tempo, dimostrata da RM(d) o secondo attacco.
Progressione neurologica insidiosa suggestiva di SM.	Un anno di progressione di malattia (determinata prospettivamente o restrospettivamente) E 2 dei seguenti criteri: 1)RM encefalica positiva (9 lesioni in T2 o 4-8 lesioni in T2 con VEP anomali(e)); 2)RM spinale positiva (2 lesioni in T2); 3)liquor positivo(c).

(a) Nessuna indagine aggiuntiva è richiesta; comunque qualora gli esami complementari (RM e liquor) fossero eseguiti e risultassero NEGATIVI, estrema cautela andrà presa prima di fare diagnosi di SM. Diagnosi alternative andranno considerate. Non dovrà esserci spiegazione alternativa migliore per il quadro clinico.
(b) La dimostrazione della disseminazione nello spazio con la RM deve soddisfare i criteri di Barkhof et al e Tintoré et al. (vedi tabella 2).
(c) Il liquor per essere positivo deve presentare bande oligoclonali dimostrate con le metodiche stabilite (preferibilmente isoelectrofocusing) differenti da eventuali bande nel siero o un aumentato IgG index (indice di Link).
(d) La dimostrazione della disseminazione nel tempo con la RM deve soddisfare i criteri in tabella 3.
(e) I PEV per essere anomali devono essere del tipo visto in SM (aumento di latenza con forma dell'onda conservata).

Tabella 2. Criteri di Barkhof per la dimostrazione della disseminazione nello spazio tramite RM.

Almeno 3 dei seguenti 4 criteri:

1) 1 lesione captante o 9 lesioni iperintense in T2;
2) almeno 1 lesione infratentoriale;
3) almeno 1 lesione iuxtacorticale;
4) almeno 3 lesioni periventricolari.

NB. Una lesione midollare può essere considerata equivalente ad una encefalica infratentoriale: una lesione midollare captante è equivalente ad una encefalica captante, e una lesione midollare può contribuire insieme a quelle encefaliche nel raggiungimento del numero richiesto di lesioni in T2.

Tabella 3. Criteri per la dimostrazione della disseminazione nel tempo tramite RM.

Uno dei seguenti è sufficiente:

1) Dimostrazione di una lesione captante almeno 3 mesi dopo l'inizio dell'evento clinico iniziale. Tale lesione è significativa solo se non si trova nel sito corrispondente all'evento iniziale;
2) Dimostrazione di una nuova lesione in T2 a qualunque distanza di tempo da una RM di riferimento eseguita almeno 30 giorni dopo l'inizio dell'evento clinico.

NB. Definizioni:

Attacco: si intende per attacco una recidiva tipica per SM riferita dal paziente o definita da osservazione obiettiva che duri almeno 24h. Qualora però la recidiva sia riferita come sintomo dal paziente, una dimostrazione obiettiva della lesione è comunque necessaria. Un singolo episodio parossistico (ad es. uno spasmo tonico) non costituisce recidiva, ma più episodi che si ripetono per un arco di tempo non inferiore alle 24h lo sono.

Il tempo minimo per separare 2 attacchi è di 30 giorni (disseminazione nel tempo) dall'inizio del primo evento all'inizio del secondo.

Disseminazione nello spazio e nel tempo in RM: in ogni caso le lesioni encefaliche devono essere maggiori di 3 mm in diametro per essere significative. Le lesioni midollari sono significative se non conducono (o minimamente) a un rigonfiamento midollare, hanno un diametro maggiore di 3 mm, non superano in lunghezza 2 segmenti vertebrali, occupano solo una parte della sezione trasversale del midollo.

Più recentemente, infine, nel 2010 Polman e collaboratori hanno ulteriormente modificato i suddetti criteri diagnostici, apportando una semplificazione significativa al processo diagnostico in quanto le caratteristiche cliniche e di RM del paziente sono decisamente meno restrittive[111]. Tali criteri sono di seguito riportati.

Tabella 4. Criteri di Polman 2010 per la diagnosi di SM.

Clinical Presentation	Additional Data Needed for MS Diagnosis
≥2 attacks[a]; objective clinical evidence of ≥2 lesions or objective clinical evidence of 1 lesion with reasonable historical evidence of a prior attack[b]	None[c]
≥2 attacks[a]; objective clinical evidence of 1 lesion	Dissemination in space, demonstrated by: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord)[d]; or Await a further clinical attack[a] implicating a different CNS site
1 attack[a]; objective clinical evidence of ≥2 lesions	Dissemination in time, demonstrated by: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack[a]
1 attack[a]; objective clinical evidence of 1 lesion (clinically isolated syndrome)	Dissemination in space and time, demonstrated by: For DIS: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord)[d]; or Await a second clinical attack[a] implicating a different CNS site; and For DIT: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack[a]
Insidious neurological progression suggestive of MS (PPMS)	1 year of disease progression (retrospectively or prospectively determined) plus 2 of 3 of the following criteria[d]: 1. Evidence for DIS in the brain based on ≥1 T2 lesions in the MS-characteristic (periventricular, juxtacortical, or infratentorial) regions 2. Evidence for DIS in the spinal cord based on ≥2 T2 lesions in the cord 3. Positive CSF (isoelectric focusing evidence of oligoclonal bands and/or elevated IgG index)

If the Criteria are fulfilled and there is no better explanation for the clinical presentation, the diagnosis is "MS"; if suspicious, but the Criteria are not completely met, the diagnosis is "possible MS"; if another diagnosis arises during the evaluation that better explains the clinical presentation, then the diagnosis is "not MS."

[a]An attack (relapse; exacerbation) is defined as patient-reported or objectively observed events typical of an acute inflammatory demyelinating event in the CNS, current or historical, with duration of at least 24 hours, in the absence of fever or infection. It should be documented by contemporaneous neurological examination, but some historical events with symptoms and evolution characteristic for MS, but for which no objective neurological findings are documented, can provide reasonable evidence of a prior demyelinating event. Reports of paroxysmal symptoms (historical or current) should, however, consist of multiple episodes occurring over not less than 24 hours. Before a definite diagnosis of MS can be made, at least 1 attack must be corroborated by findings on neurological examination, visual evoked potential response in patients reporting prior visual disturbance, or MRI consistent with demyelination in the area of the CNS implicated in the historical report of neurological symptoms.

[b]Clinical diagnosis based on objective clinical findings for 2 attacks is most secure. Reasonable historical evidence for 1 past attack, in the absence of documented objective neurological findings, can include historical events with symptoms and evolution characteristics for a prior inflammatory demyelinating event; at least 1 attack, however, must be supported by objective findings.

[c]No additional tests are required. However, it is desirable that any diagnosis of MS be made with access to imaging based on these Criteria. If imaging or other tests (for instance, CSF) are undertaken and are negative, extreme caution needs to be taken before making a diagnosis of MS, and alternative diagnoses must be considered. There must be no better explanation for the clinical presentation, and objective evidence must be present to support a diagnosis of MS.

[d]Gadolinium-enhancing lesions are not required; symptomatic lesions are excluded from consideration in subjects with brainstem or spinal cord syndromes.

MS = multiple sclerosis; CNS = central nervous system; MRI = magnetic resonance imaging; DIS = dissemination in space; DIT = dissemination in time; PPMS = primary progressive multiple sclerosis; CSF = cerebrospinal fluid; IgG = immunoglobulin G.

Analisi del liquido cerebrospinale (LCS)

Il liquido cerebrospinale nella SM si presenta limpido e con normali valori pressori. Gli elementi cellulari sono presenti in numero normale (meno di 5 cellule per mm^3) o solo lievemente aumentato nel 15-35% dei casi. In quest'ultimo gruppo di pazienti, in modo particolare in quelli che hanno avuto un esordio acuto o un successivo episodio di esacerbazione della malattia, è presente una modesta pleiocitosi mononucleare, inferiore comunque a 50 cellule/mm^3. Questa pleiocitosi costituisce, di fatto, l'unico elemento di giudizio da un punto di vista del laboratorio per la valutazione dell'attività di malattia, dal momento che gli altri esami, fatta eccezione per la proteina basica della mielina, non riflettono l'andamento della patologia.

Nel 40% dei pazienti il contenuto totale di proteine del liquor risulta aumentato (raramente superiore ai 10 mg/ml). L'alterazione liquorale più tipica della SM è rappresentata dall'aumento percentuale delle gammaglobuline (Ig), essenzialmente IgG, che rappresentano più del 12% delle proteine totali. Il *target* di queste Ig liquorali rimane tuttora ignoto a dispetto dei numerosi studi fino ad ora condotti; verosimilmente queste Ig rappresentano una risposta cellulare B aspecifica diretta contro un ampio pannello di antigeni, espressione di una generica attivazione immunitaria. L'indice di sintesi intratecale di Ig, utilizzato nella diagnosi di SM è l'IgG Index (o indice di Link), che si ottiene dopo il dosaggio nel siero e nel liquor dell'albumina e delle Ig, applicando la seguente formula: (IgG LCS/IgG siero)/(albumina LCS/albumina siero)[112]. Un rapporto superiore a 1.7 è indice dell'origine intratecale delle Ig e depone a favore della presenza di SM.

È stato dimostrato appunto che le Ig presenti nel liquor di pazienti affetti da SM vengono sintetizzate a livello del SNC e che all'elettroforesi in gel di agarosio migrano come distinte popolazioni patologiche, le cosiddette bande oligoclonali (BO) di IgG[113]. In corso di SM, dunque, le Ig presentano una restrizione oligoclonale, definibile come due o più bande di immunoglobuline IgG, presenti nel liquor e non nel siero o più numerose nel liquor che nel siero, che si iscrivano

nettamente su un *background* di IgG policlonali a un punto isoelettrico superiore a 6.5, quando separate mediante *isoelettrofocusing*[114]. Il calcolo dell'IgG index e la ricerca delle BO, se eseguiti parallelamente, evidenziano la presenza di alterazioni nella composizione del liquor nel 95% circa dei casi di SM. D'altra parte, come per tutti gli esami ad elevata sensibilità, risulta alto il rischio di reperti falsamente positivi: in questa quota si annoverano tutti i possibili processi infiammatori acuti o cronici, inclusi quelli di natura infettiva, con interessamento del SNC e, occasionalmente, anche periferico (neurosifilide, neuroborreliosi, encefalomielite acuta disseminata, panencefalite sclerosante subacuta, ecc.).

Per quanto riguarda le CIS, uno studio di Tintoré e collaboratori[115] ha evidenziato un'elevata prevalenza delle BO in questo gruppo di pazienti (62.5%), ma in altri studi la prevalenza è anche maggiore. In aggiunta ai criteri clinici e ai dati di RM, si ottiene un'elevata sensibilità ed un alto valore predittivo negativo. Tuttavia è anche vero che la presenza o assenza di BO non cambia in genere la decisione terapeutica, pertanto non è necessaria la loro ricerca in un paziente con clinica suggestiva di SM e riscontro RM di disseminazione spaziale e temporale della malattia. Non è ben chiaro invece se pazienti con CIS ed esame RM negativo ma con BO positive siano a maggior rischio di sviluppare una SM clinicamente definita, anche se nella sua variante benigna, come ipotizzato da alcuni autori[116]. Attraverso l'impiego di un saggio radioimmunologico molto sensibile è stato anche dimostrato che in molti pazienti il liquor, durante le fasi di peggioramento della malattia, contiene livelli molto elevati della proteina basica della mielina. Questi livelli sono solo lievemente aumentati o normali nelle forme di SM a lenta progressione, mentre sono pressoché normali durante i periodi in cui si verifica un miglioramento della malattia[117]. Tuttavia, dal momento che altre lesioni che distruggono la mielina (per esempio infarti) possono aumentare i livelli di proteina basica della mielina, questo test diagnostico non è da considerarsi particolarmente specifico. Al momento, dunque, il dosaggio delle gammaglobuline come frazione delle proteine totali e la ricerca delle BO nel liquor rimangono i più affidabili esami di laboratorio per la SM.

Test neurofisiologici

I test neurofisiologici sono costituiti dai potenziali evocati multimodali (PE), che vengono usati per dimostrare la presenza di anomalie nella conduzione nervosa. Affinché un PE risulti alterato, è necessario che le lesioni siano sufficientemente ampie ed estese da provocare un significativo rallentamento o un blocco della conduzione nervosa. Il difetto di conduzione si evidenza attraverso un aumento della latenza, mentre l'ampiezza del potenziale è in genere invariata. I potenziali evocati permettono di dimostrare alterazioni subcliniche, di evidenziare lesioni asintomatiche e di confermare quindi un interessamento multifocale della malattia (disseminazione spaziale). Ciò avviene tramite la dimostrazione di un rallentamento della conduzione nervosa lungo le vie visive (potenziali evocati visivi o PEV), le vie acustiche del tronco encefalico (potenziali acustici del tronco encefalo o BAEP), le vie sensoriali somatiche (potenziali somatosensoriali o PESS) e lungo la via motoria piramidale (potenziali motori o PEM).

I PEV sono quelli più frequentemente alterati nei pazienti affetti da SM. Le percentuali di anormalità di risposta sono generalmente pari al 90% nei pazienti con storia clinica di NORB e a più del 60% dei casi di SM *definita,* anche in assenza di una precisa storia di turbe visive. Nonostante i PEV rappresentino il test neurofisiologico con la più alta frequenza di alterazione nella SM, è opportuno ricordare che le anomalie di risposta del PEV sono aspecifiche, potendosi riscontrare anche in altre malattie neurologiche (degenerazioni spinocerebellari, polineuropatie infiammatorie demielinizzanti croniche, ecc.).

Nel caso dei PE, anche associando più metodiche di indagine (PE multimodali), il contributo diagnostico rimane comunque inferiore rispetto a quello della RM e all'esame liquorale.

Esami neuroradiologici

La RM e le tecniche correlate rappresentano la metodica più sensibile, benché scarsamente specifica, per definire la diagnosi e monitorare l'evoluzione della malattia. La capacità della RM di visualizzare lesioni clinicamente asintomatiche,

ha condotto all'uso di questa tecnica per documentare la disseminazione spaziale delle lesioni in pazienti con sintomi suggestivi di SM. Il ruolo della RM in corso di SM verrà successivamente più ampiamente discusso in una sezione dedicata. In generale comunque nelle immagini pesate in densità protonica (DP) o T2 si evidenzia tipicamente la presenza di aree iperintense nella sostanza bianca. Nelle stesse sequenze alcuni criteri aumentano sensibilmente l'accuratezza della diagnosi. Tra questi la presenza di aree periventricolari, di lesioni in fossa cranica posteriore e nella corona radiata sopra il corpo calloso, di lesioni di diametro >6 mm. In T1 si possono riscontrare aree ipointense che identificano placche croniche (i cosiddetti buchi neri o *black holes*), al contrario lesioni acute visibili in DP/T2 spesso non sono visualizzabili in T1. I buchi neri correlano parzialmente con la disabilità e con la progressione della malattia soprattutto nelle forme secondariamente progressive, essendo il deficit neurologico espressione di marcata demielinizzazione, perdita assonale e gliosi.
L'utilizzo del mezzo di contrasto paramagnetico (gadolino) nelle sequenze T1, permette di evidenziare lesioni attive, espressione di un'alterazione della permeabilità della BEE.

Prognosi

Anche se è particolarmente difficile, in una patologia così imprevedibile, formulare una prognosi corretta, alcuni fattori possono essere presi in considerazione: il decorso è più favorevole nel sesso femminile, l'esordio precoce è associato ad una prognosi migliore, mentre l'esordio tardivo è spesso seguito da un decorso progressivo con rapida disabilità. Sintomi d'esordio di tipo sensitivo e interessamento dei nervi cranici, come il nervo ottico, sono associati ad un decorso più favorevole rispetto ai casi che iniziano con sintomi piramidali o cerebellari.
La SM, per sé stessa, non è causa di morte. L'aspettativa di vita per i soggetti affetti è solo di alcuni anni ridotta rispetto alla popolazione generale. La morte avviene in genere per cause almeno in parte legate alla disabilità, più spesso per

problematiche respiratorie settiche (polmoniti *ab ingestis*). Circa il 50% dei decessi, comunque, non è direttamente correlato alla malattia[118].

La media di sopravvivenza è di 30 anni, mentre la mediana è di 17 anni. Tale discrepanza suggerisce una distribuzione asimmetrica, data probabilmente dalla presenza di un sottogruppo con bassa sopravvivenza. Nei pazienti con SM, quindi, la sopravvivenza attesa corrisponde a circa l'80% di quella della popolazione generale, equivalente per età e sesso[119]. Diversi studi longitudinali hanno riscontrato che l'invalidità a 5 anni dall'esordio è fortemente predittiva del successivo decorso della malattia.

Il passaggio da una SMRR ad una SMSP è definito dall'accumularsi di disabilità progressiva, indipendente dagli attacchi. Confavreux e colleghi hanno riportato, grazie ad uno studio condotto su 1488 pazienti affetti da SM, che fattori quali età, sesso, sintomi d'esordio, decorso (a ricadute-remissioni o progressivo), grado di recupero dal primo attacco, intervallo di tempo tra prima e seconda ricaduta e numero di ricadute nei primi 5 anni di malattia, influenzano significativamente la mediana dell'intervallo di tempo che intercorre tra l'esordio e il raggiungimento di un punteggio pari a 4.0, 6.0 e 7.0 nella scala di disabilità EDSS di Kurtzke[120]. Inoltre, mentre l'intervallo di tempo tra esordio e invalidità grave (6.0-7.0 nell'EDSS di Kurtzke) dipende significativamente da quello tra esordio e invalidità moderata (4.0 nell'EDSS di Kurtzke), non è stata trovata alcuna variabile clinica in grado di influenzare in modo significativo l'intervallo di tempo tra disabilità pari a 4.0 e disabilità pari 6.0-7.0[120].

Infine, frequenti recidive sono associate ad un peggiore decorso della malattia; i pazienti con attacchi frequenti hanno una prognosi sostanzialmente peggiore[121,122].

Leray e collaboratori[315] hanno dimostrato come la SM sia una patologia con due fasi di malattia effettivamente distinte, una prima fase (fase 1) definita dall'esordio fino ad un EDSS di 3.0 ed una seconda fase (fase 2) da EDSS 3.0 a 6.0. I suddetti punteggi rappresentano punti chiave nella scala EDSS, corrispondendo rispettivamente al passaggio da disabilità globale lieve a moderata ed

all'instaurarsi di un deficit deambulatorio tale da richiedere l'assistenza unilaterale. Studiando un ampio campione di pazienti (2054 di cui 1609 RR e 445 PP), gli autori hanno evidenziato come la progressione della disabilità durante la fase 2 fosse indipendente da quella della fase 1. Infatti la durata media della fase 2 era pressocchè identica (variabile dai 6 ai 9 anni) indipendentemente dalla durata della fase 1 (<3, da 3 a <6, da 6 a <10, da 10 a <15 o ≥15 anni, divisione arbitraria definita allo scopo di creare gruppi numericamente omogenei) per tutta la coorte di pazienti e per entrambi i fenotipi clinici di malattia considerati singolarmente. Inoltre la percentuale di pazienti che raggiunse il punteggio 6.0 non era diversa tra i cinque sottogruppi, in riferimento sia alla popolazione totale che ai singoli fenotipi remittente o progressivo. Il potenziale effetto confondente della terapia è stato inoltre escluso considerando in un secondo tempo solo i pazienti non trattati, ottendento lo stesso risultato. Infine, per quello che concerne il fenotipo RR, il sesso, l'età d'esordio, il deficit clinico residuo dopo la prima ricaduta ed il numero di ricadute durante i primi 2 anni di malattia sono stati individuati come fattori predittivi indipendenti di progressione della disabilità solo per la fase 1.

In conclusione l'ipotesi che deriva dalle loro osservazioni è che l'accumulo di disabilità nel paziente SM segua effettivamente un decorso bifasico, con un primo periodo (fino al punteggio EDSS sostenuto 3.0) dipendente dai classici fenomeni di infiammazione multifocale ed una seconda fase (dal punteggio EDSS sostenuto 3.0 al punteggio EDSS sostenuto 6.0) indipendente dai suddetti, probabilmente legata all'instaurarsi di fenomeni degenerativi già prima di una possibile conversione a forma progressiva conclamata.

Terapia

Una terapia ottimale per il trattamento della SM dovrebbe agire su vari fronti per ritenersi davvero efficace. Dovrebbe: a) curare i sintomi caratteristici della malattia, b) ridurre la frequenza, la severità e la durata delle recidive, c) prevenire la disabilità causata dalla progressione della malattia e d) promuovere i

processi di riparazione per ripristinare le normali funzioni del sistema nervoso senza particolari effetti collaterali legati al trattamento farmacologico[123].
La terapia della SM si divide in sintomatica e preventiva.

Terapia sintomatica

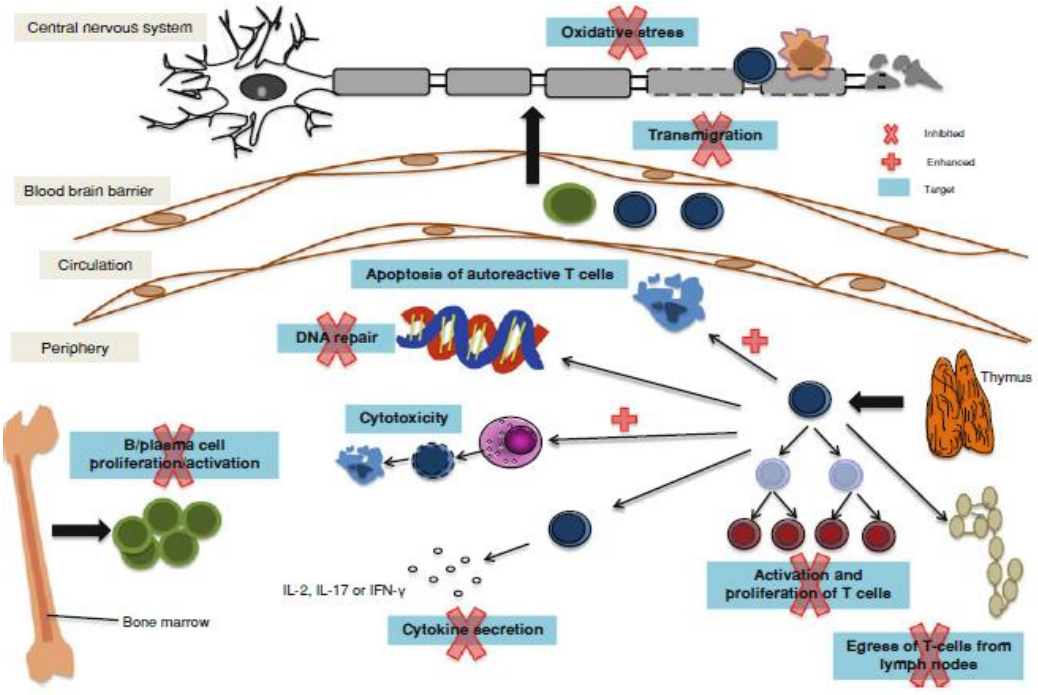
La terapia sintomatica comprende:

1) Il trattamento dell'attacco acuto, il cui obiettivo è accelerare la remissione dei sintomi e segni in corso di una ricaduta clinica. A tale scopo si usano i corticosteroidi ad alti dosaggi[124-126] e per brevi periodi di tempo (il regime usuale prevede l'infusione endovenosa giornaliera per 5 gg di 1 gr di metilprednisolone). L'intervento precoce con steroidi può abbreviare la durata di un attacco di SM, ma non ha alcuna efficacia nel modificare l'entità dei deficit neurologici residui e, inoltre, non è in grado di modificare la frequenza delle esacerbazioni;
2) Il trattamento farmacologico o fisioterapico di sintomi cronici quali spasticità, fatica, disfunzioni sfinteriche/sessuali, tremore, alterazioni del tono dell'umore, dolore. La terapia sintomatica prevede il trattamento dei sintomi cronici propriamente detti e può avvalersi di trattamenti farmacologici volti a trattare un ben determinato sintomo, e non farmacologici, come la fisioterapia e gli interventi psicologici. I trattamenti maggiormente utilizzati sono: il gabapentin, la carbamazepina ed altri anticonvulsivanti per controllare i fenomeni parossistici; l'amantadina per la fatica; l'oxibutinina e la tolterodina per l'incontinenza urinaria; il baclofen, la tizanidina ed il gabapentin per la spasticità; gli antidepressivi, soprattutto inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) nel caso di pazienti che soffrono di depressione[127].

Terapia preventiva

Ad oggi il panorama terapeutico della SM è molto vasto e soprattutto quello che sorprende maggiormente è stata la rapidissima espansione del numero dei trattamenti approvati se consideriamo che sino a circa 10 anni fa le uniche terapie specifiche erano gli interferoni ed il copolimero. Grazie alla conoscenza sempre maggiore dei meccanismi fisiopatologici che portano al generarsi della placca infiammatoria a partire dal linfocita nella sua residenza periferica negli organi linfoidi, la ricerca farmaceutica è riuscita a generare diverse molecole con diversi target terapeutici. Nella figura 3 un riassunto dei principali meccanismi patologici in corso di SM che possono servire da potenziali target teraputici.

Figura 3. Processi coinvolti nella fisiopatologia della SM che servono come potenziali target terapeutici (da Ali R et al. 2013)[128].



Le terapie preventive (*disease modifying drugs*-DMD) si dividono in terapie immunomodulanti ed immunosoppressive. Un paragrafo a parte è dedicato alle nuove molecole orali, di fatto da considerarsi a tutti gli effetti molecole immunosoppressive.

Le terapie immunomodulanti comprendono farmaci quali l'interferone beta (IFNβ), il copolimero-1 (COP-1) e le immunoglobuline endovena (IVIG). Le terapie immunosoppressive comprendono invece l'azatioprina (AZA), il mitoxantrone (MTX), la ciclofosfamide, la ciclosporina, il metotrexate. Mentre le molecole immunomodulanti agiscono appunto come modulatori del sistema immunitario, regolando la funzione delle diverse popolazioni linfocitarie, con azione di stimolazione su alcune e di inibizione su altre, gli immunosoppressori viceversa riducono globalmente la funzione di tutte le popolazioni linfocitarie.

Trattamenti immunomodulanti

Interferone β

Studi clinici controllati in pazienti affetti da SMRR, hanno dimostrato che l'IFNβ riduce significativamente la frequenza annua delle recidive (di circa il 30%) e l'accumularsi delle nuove lesioni cerebrali demielinizzanti, documentabili con la RM[129-131]. L'IFNβ svolge un'azione immunomodulatoria essendo in grado di antagonizzare le citochine proinfiammatorie. Il razionale dell'impiego precoce di questo farmaco si basa sul buon profilo di sicurezza a breve e a lungo termine e sull'evidenza che la terapia è tanto più efficace quanto prima venga iniziata.

L'IFNβ è in grado di ridurre l'espressione del MHC-II sulle APC e l'espressione di molecole costimolatorie come CD80 e CD40 (sulle APC) o CD40L e CD28 (sulle cellule T), inibisce inoltre l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T, provoca la sovraespressione dell'antigene linfocitario citotossico 4 (CTLA4, altrimenti noto come CD152) e della molecola Fas sulle cellule T CD4+, favorendone l'apoptosi. Altri meccanismi farmacodinamici includono la riduzione della capacità migratoria delle cellule patogene T nel SNC, riducendo l'espressione dell'integrina *very late antigen* 4 (VLA-4), ed il ripristino delle funzioni della cellula T suppressor, probabilmente aumentando l'espressione di IL-10 e TGFβ.

Lo studio europeo ETOMS (*Early Treatment of Multiple* Sclerosis)[132] ha seguito per due anni l'andamento della malattia in pazienti con primo episodio

neurologico acuto suggestivo di SM e la loro risposta al trattamento con IFNβ-1a. La percentuale di pazienti evoluti verso SM clinicamente definita è stata del 45% nel gruppo trattato con placebo e del 35% nel gruppo trattato con IFNβ-1a, con una riduzione relativa del 24% del rischio di conversione a SM clinicamente definita. Inoltre, il trattamento con interferone ha determinato una significativa riduzione del tasso annuale di recidive, del numero di lesioni attive e del carico lesionale totale valutati con la RM.

Uno studio simile, effettuato in Nord America (*Controlled High Risk Avonex MS Prevention Study*-CHAMPS), ha fornito risultati analoghi della terapia con IFNβ-1a in pazienti con primo episodio monosintomatico suggestivo di SM[130]. Lo studio PRISMS (*Prevention of relapses and Disability by IFNβ-1a subcutaneously in multiple sclerosis*) ha evidenziato una riduzione significativa del tasso di ricaduta e dell'attività RM nei pazienti trattati con IFNβ-1a sottocute 22 o 44 mcg rispetto al placebo[133].

Ad oggi comunque non esistono studi che abbiano dimostrato *inequivocabilmente* l'efficacia di un trattamento precoce nel modificare la prognosi della malattia. Nondimeno, gli studi epidemiologici suggeriscono che un breve intervallo di tempo tra l'episodio iniziale e il secondo sia associato ad una cattiva prognosi, e quindi un trattamento che ritardi il verificarsi del secondo episodio, come la terapia con interferone, può avere un effetto favorevole anche sull'evoluzione a lungo termine della malattia[134,135]. L'IFNβ esiste in due varianti 1a ed 1b, la seconda formula glicosilata rispetto alla prima, nello specifico IFNβ-1a esiste in somministrazione intramuscolare monosettimanale al dosaggio di 30 mcg/settimana (Avonex) o in formulazione sottocutanea trisettimanale al dosaggio di 22 o 44 mcg al giorno (Rebif 22 o 44); l'IFNβ-1b è in formulazione sottocute a giorni alterni al dosaggio di 250 mcg al giorno (Betaferon, Extavia). Del tutto recentemente è stato introdotto sul mercato il peg- IFNβ-1a al dosaggio di 125 mcg sottocute ogni 2 settimane (Plegridy); quest'ultima essendo molecola pegilata, ha evidenziato un profilo di efficacia diverso e apparentemente maggiore rispetto ai precedenti. In Italia l'AIFA prevede l'utilizzo di tutti questi

farmaci per il trattamento delle forme a ricadute e remissioni della malattia e del solo Betaferon o Extavia nel trattamento delle forme secondariamente progressive. Da sottolineare infine come Avonex e Betaferon siano approvati dalla *food and drug administration* (FDA) per il trattamento delle CIS che abbiano caratteri di RM compatibili con quelli di una SM.

Gli studi e l'osservazione post-commercializzazione hanno dimostrato l'estrema tollerabilità di queste molecole, anche se abbastanza comune è il riscontro di alterazione delle transaminasi e sintomi simil-influenzali in relazione alla somministrazione; raro l'instaurarsi di una tireopatia tossica o autoimmunitaria nel lungo termine.

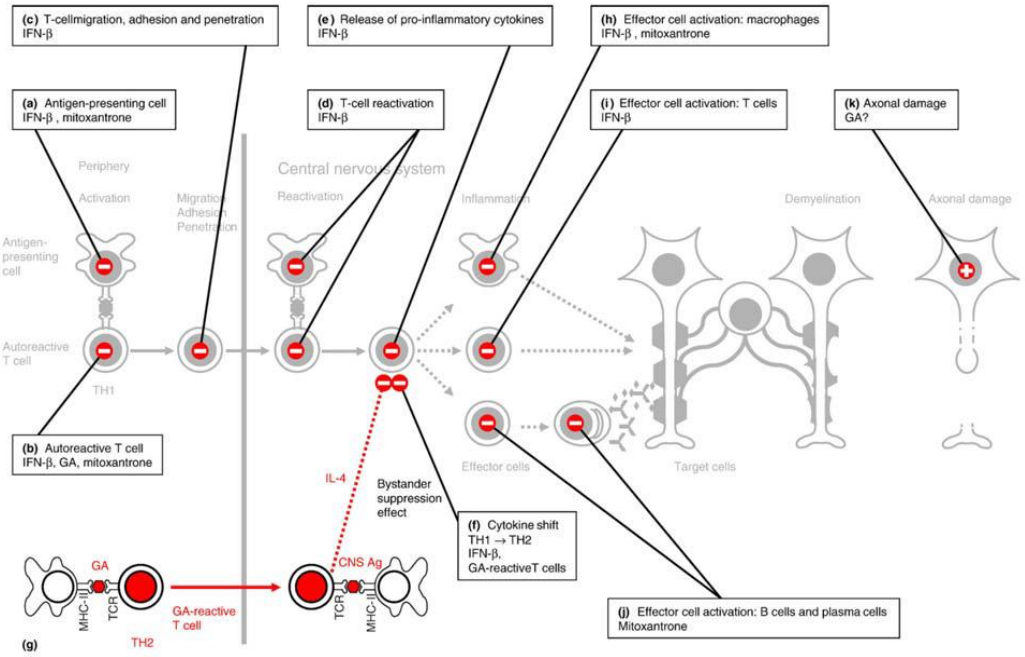
Copolimero-1 (Glatimer acetato-GA)

Un altro farmaco attualmente disponibile per il trattamento delle forme a ricadute e remissioni della malattia è il COP-1, una mistura di tetraoligopeptidi che sembrerebbe avere sia un meccanismo d'azione di tipo competitivo con le proteine della mielina o i loro frammenti peptidici, sia un'azione immunomodulante. Il GA aumenta l'attività dei linfociti T regolatori (Treg), favorisce lo scwitch del T CD4+ indotto da DC e macrofagi verso un profilo TH2, favorisce l'attività suppressor nei confronti dei CD4+ autoreattivi e potrebbe avere anche un effetto neuroprottettivo aumentando la sintesi di *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) da parte dei linfociti T. Inoltre agisce anche sulle cellule B modulando l'espressione citochinica ed alterando l'espressione di CD80, CD86 e MHC-II.

Il COP-1 è in grado di ridurre la frequenza annua delle ricadute di circa il 30%, quindi con un tasso non diverso dagli interferoni, di prolungare il tempo libero da ricadute e di ridurre l'attività di malattia alla RM nelle forme SMRR[136]. Il dosaggio previsto è quello di 20 mg al giorno sottocute tutti i giorni. Ha un buon profilo di sicurezza anche se reazioni locali cutanee sono frequenti. Di recente introduzione sul mercato la versione di 40 mg a somministrazione sempre sottocute trisettimanale.

Nella figura sottostante e nel box a seguire sono riassunti i principali meccanismi farmacodinamici di INFβ, GA e mitoxantrone (discusso in seguito).

Figura 4. Siti d'azione di interferon β, glatiramer acetato e mitoxantrone (Fonte: Neuhaus et al., J.Neurological Sciences 2007)[62].



Box 2. Siti d'azione di interferon β, glatiramer acetato e mitoxantrone.

(a) Viene inibita la presentazione dell'antigene sulle APC;
(b) Viene inibita l'attivazione dei linfociti T;
(c) Vengono inibiti i meccanismi di penetrazione, migrazione e adesione molecolare;
(d) Viene bloccata la riattivazione dei linfociti T all'interno del SNC;
(e) Viene diminuito il rilascio di citochine pro-infiammatorie dai linfociti T;
(f) Viene indotta la trasformazione da citochine TH1 pro-infiammatorie a TH2 anti-infiammatorie;
(g) Vengono indotti i linfociti TH2 con conseguente rilascio di citochine anti-infiammatorie all'interno del SNC ;
(h) Viene diminuita l'attivazione dei macrofagi o la secrezione di mediatori pro-infiammatori;
(i) Viene indotta l'apoptosi dei linfociti T autoreattivi;
(j) Viene bloccata l'attivazione dei linfociti B e la loro differenziazione in plasmacellule;
(k) Può essere ridotto il danno assonale.

Farmaci immunosoppressori

Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi farmaci immunosoppressori. Tale classe di farmaci può essere genericamente divisa in tre categorie principali, relativamente allo specifico target terapeutico: immunosoppressori che interagiscono con ligandi intracellulari, con molecole della superficie cellulare e come anti-citochine.

Farmaci agenti su ligandi intracellulari

Questa classe di farmaci può ulteriormente essere suddivisa in tre sottoclassi:

1) inibitori della calcineurina;
2) antimetaboliti;
3) agenti antiproliferativi.

La maggiorparte di queste molecole è oggigiorno decisamente poco usata, grazie soprattutto alla commercializzazione del Natalizumab e degli immunosoppressori orali. In casi estremi farmaci come l'AZA, la ciclofosfamide, la ciclosporina, il metotrexate, il mitoxantrone e le tecniche di plasmaferesi, rappresentano un'alternativa per le forme progressive di malattia o per le forme RR non controllabili con le terapie convenzionali. Infatti, la tossicità della maggior parte di questi trattamenti, associata ai loro modesti benefici, limita ampiamente il loro ruolo nell'impiego clinico. Ad ogni modo l'unica di queste molecole approvata dall'AIFA per il trattamento della SM è il mitoxatrone, le altre sono da considerarsi molecole ad uso *off-label*.

1) Il principale rappresentante degli inibitori della calcineurina è la Ciclosporina A che, sebbene promettente negli studi sperimentali, si è dimostrata inefficace e con gravi effetti collaterali sull'uomo e quindi abbandonata.

2) I farmaci antimetaboliti includono molecole che interferiscono con la sintesi del DNA e quindi con la replicazione cellulare. Quelle dotate di una certa efficacia e già in uso sono l'Azatioprina, il Metotrexate, il Micofenolato Mofetile.

La *Teriflunomide* è una molecola appartenente a questa sottoclasse farmacologica ed è attualmente in commercio in compresse da 14 mg (Aubagio).

Presenta un buon profilo di efficacia e tollerabilità e il vantaggio della somministrazione per via orale. La molecola viene rapidamente assorbita a stomaco vuoto. Il meccanismo d'azione risiede nell'inibizione dell'enzima diidro-orotato-deidrogenasi (DHODH), enzima mitocondriale deputato alla sintesi de novo delle pirimidine. Dato che la sintesi delle pirimidine si svolge anche indipendentemente da questo enzima, il blocco funzionale del suddetto limita la replicazione cellulare solo delle cellule ad alto tasso replicativo come i linfociti attivati[137-139]. Inoltre il farmaco antagonizza la migrazione del linfocita T, il *signaling* tra le cellule T dopo attivazione da parte delle APC favorendo la loro differenziazione in TH2, riduce la produzione di anticorpi e lo switch a IgG1 indotto dall'IL-4 nei linfociti B[140,141].

Lo studio TEMSO (*Teriflunomide Multiple Sclerosis Oral*)[142,143] è stato il primo studio di fase III condotto su questa molecola e ha analizzato la somministrazione di 7 o 14 mg giornalieri di teriflunomide contro placebo. I risultati sono stati una riduzione del tasso di ricaduta annuale relativo e del rischio relativo di progressione sostenuta, rispettivamente del 31% e del 30% (in quest'ultimo caso solo nel gruppo 14 mg). L'*outcome* di RM ha evidenziato una riduzione del numero di nuove lesioni e di lesioni attive. Globalmente l'efficacia della Teriflunomide appare quindi paragonabile a quella degli immunomodulanti convenzionali. Infatti lo studio TENERE (Teriflunomide 7 e 14 mg contro IFNβ-1a 44 mcg trisettimanale) non ha messo in evidenza differenze significative in termini di *outcome* clinico e di RM tra i tre gruppi. Gli effetti collaterali comuni sono prevalentemente gastrointestinali, con dolore, diarrea, dispepsia, nausea, vomito, ulcere orali ma anche aumento delle transaminasi, alopecia, *rash* cutaneo ed ipertensione. Effetti collaterali seri sono stati descritti come rari nei diversi studi ed includono insufficienza epatica, neutropenia, polmonite interstiziale (precedente uso di metotrexate), leucoencefalopatia multifocale progressiva (*progressive multifocal leukoencephalopathy*-PML) (precedente immunosoppressione). I test di funzionalità epatica sono obbligatori ogni 15 giorni per i primi 6 mesi e ogni 2 mesi successivamente. È inoltre consigliato il

controllo della pressione arteriosa. Da segnalare infine la terogenicità del farmaco, pertanto è raccomandato l'utilizzo di metodi anticoncezionali.

3) La Ciclofosfamide e il Mitoxantrone sono i principali esponenti degli agenti antiproliferativi. Sebbene siano farmaci di provata efficacia, la frequente insorgenza di effetti collaterali ne limita la possibilità di utilizzo.

Farmaci agenti su ligandi di superficie

Negli ultimi 10 anni, come già detto precedentemente, le strategie terapeutiche per la SM hanno conosciuto un notevole cambiamento. Grazie all'avanzamento delle conoscenze sull'immunopatogenesi della malattia sono stati individuati nuovi potenziali trattamenti farmacologici. Essi superano il punto di vista tradizionale che la SM sia semplicemente una malattia del SNC mediata da cellule T, e agiscono quindi a diversi livelli del sistema immunitario[144].

Tra le più recenti strategie terapeutiche per la SM, gli anticorpi monoclonali (*Monoclonal Antibodies*-MAb) rappresentano la classe in maggiore sviluppo e sembrano costituire il nuovo arsenale terapeutico per tutte le patologie con una componente immunitaria.

Inizialmente, l'impiego terapeutico dei MAb era limitato a causa dei problemi di immunogenicità determinati dalla loro natura non umana. Successivamente, i ricercatori hanno cercato di superare tale limite, sviluppando composti umanizzati (struttura al 90% umana e il 10% murina), chimerici (~66% umana e ~34% murina) o completamente umani (100% umana)[145].

I fattori che determinano le modalità con cui un MAb agisce sul suo target sono:

1. la funzione e la distribuzione del target;
2. l'interazione del MAb con il target, che può essere di tre tipi:
    a) di legame: il MAb si lega alla molecola ma non interferisce con la sua funzione, ad esempio funge esclusivamente da marker per la distruzione della molecola stessa o per un suo legame con una tossina;
    b) di blocco: il MAb blocca l'epitopo necessario per l'interazione con un ligando;

c) di segnalazione: il MAb mima la funzione di un ligando che rappresenta un segnale tra molecole.

3. l'effetto del MAb: il MAb può mediare la risposta citotossica e distruggere così le cellule colpite. Tali funzioni dipendono dal dominio Fc e dalla sua interazione con le cellule del sistema immunitario;

4. l'accesso del MAb al SNC: i MAb sono molecole molto grandi e pertanto necessitano di essere trasportate attraverso la barriera ematoencefalica. Tale trasporto è in genere limitato (~0,1% del farmaco somministrato sistemicamente raggiunge il compartimento intratecale), tuttavia nei pazienti con SM risulta essere superiore a causa delle lesioni presenti[146].

Di seguito sono descritte le caratteristiche dei MAb utililizzabili per il trattamento della SM, già attualmente impiegati in clinica o che rientrano in protocolli di studio di fase II o III (per un riepilogo si veda la Tabella 5).

Tabella 5. Target ed effetti dei MAb per la SM (Fonte: Bielekova B et al., Neurology 2010)[146].

Farmaco	***Target***	***Effetti***
Natalizumab	CD49d (VLA-4)	Inibizione della migrazione delle cellule immunitarie nel SNC; inibizione del ricambio delle cellule presentanti l'antigene nel SNC; mobilizzazione dei precursori dei linfociti (CD34+ e cellule pre-B) dal midollo osseo.
Rituximab	CD20	Deplezione delle cellule B.
Alemtuzumab	CD52	Deplezione delle cellule che presentano CD52 (linfociti T e B, cellule natural Killer, macrofagi, cellule dendritiche e alcuni granulociti).
Daclizumab	CD25 (IL-2Rn)	Inibizione del segnale di IL-2, lieve inibizione della proliferazione delle cellule T.

Natalizumab

Da diversi anni il Natalizumab (Tysabri) è ormai di uso comune, per la sua estrema efficacia, per il trattamento delle forme recidivanti di SM. Il Natalizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro le α-4 β-1 integrine. Le α-4 β-1, conosciute anche come *very late antigen*-4 (VLA-4) sono espresse sulla superficie dei linfociti attivati ed interagiscono con i loro recettori espressi sulla

superficie interna dell'endotelio vascolare, *le vascular cell adhesion molecule* (VCAM); il risultato è l'inibizione della migrazione dei linfociti attivati all'interno del SNC e quindi l'impedimento della genesi del processo infiammatorio ed del danno alle fibre nervose[147]. Lo studio AFFIRM (*Natalizamab safety and efficacy in RRMS*) ha valutato l'efficacia del Natalizumab (300 mg ev 1/mese) contro placebo, evidenziando una riduzione del tasso annuo di ricaduta clinica del 68% ed una riduzione del 42% del rischio di progressione sostenuta della disabilità a 2 anni. L'attività RM era inoltre ridotta del 92% nel gruppo trattato[148,149]. Il Natalizumab è stato quindi rapidamente commercializzato sotto il nome di Tysabri al dosaggio di 300 mg ev una volta al mese. In Italia L'AIFA autorizza la somministrazione del Natalizumab solo nei pazienti SMRR che abbiano fallito le terapie immunodulanti (cosiddetta I linea) o che abbiano un quadro clinico e di RM particolarmente a rischio.

Il principale potenziale rischio di terapia con Natalizumab è l'insorgenza di PML, quandro encefalitico con scarsa componente infiammatoria legato al processo di diffusa riattivazione e replicazione del virus JCV, con conseguente massiva oligodendrocitolisi. Il rischio di PML nei primi 24 mesi di somministrazione è sommariamente di circa 1 caso su 1000 trattati nei pazienti sieroposivi per JCV (essendo vicino allo 0 nei soggetti sieronegativi). Purtroppo il rischio aumenta di circa 8 volte dopo 2 anni di terapia, pertanto, fino a circa 5 anni fa, era consenso generale la sospensione del trattamento alla fine dei 2 anni. Ad oggi, grazie all'introduzione di una metodica per titolare gli anticorpi anti-JCV su siero, è possibile ulteriormente stratificare il rischio dei pazienti JCV+. Ciò ha permesso la continuazione della somministrazione oltre i 2 anni nei pazienti con basso titolo anticorpale.

Rituximab

Nonostante gli studi sulla fisiopatologia della SM si siano focalizzati principalmente sulle cellule T, le recenti evidenze scientifiche suggeriscono anche il ruolo patogenetico chiave dei linfociti B che quindi, a tutti gli effetti,

rappresentano un importante potenziale target terapeutico. Il rituximab, infatti, è un anticorpo chimerico che lega l'antigene CD20 espresso esclusivamente sui linfociti B maturi, ma non sulle plasmacellule e sulle cellule staminali ematopoietiche. Pertanto, il principale meccanismo d'azione del rituximab è la completa, ma transitoria, deplezione delle cellule B mediata sia da lisi cellulare complemento-mediata (*complement-dependent cytotoxicity*-CDC) che da lisi cellulare anticorpo-mediata (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*-ADCC). La deplezione B cellulare permane per diversi mesi ed è seguita da un progressivo recupero fino al totale ripristino a 12 mesi. L'immunità umorale resta integra in quanto le plasmacellule sopravvivono. Ad oggi il rituximab è autorizzato, sia dall'FDA sia dall'EMA, per il trattamento dell'artrite reumatoide e per i linfomi che interessano le cellule B (ad esempio linfoma non Hodgkin a grandi cellule B). Diversi studi clinici hanno valutato l'azione di questo anticorpo sul processo infiammatorio della SM. In uno studio aperto di fase I su pazienti con SMRR[69], il rituximab ha dimostrato un rapido e duraturo miglioramento della progressione della malattia, in termini di riduzione del numero di ricadute, del numero di lesioni gadolinio-captanti, del numero e del volume di nuove lesioni T2. Simili risultati sono stati registrati in uno studio di fase II in doppio cieco che ha coinvolto 104 pazienti con la stessa tipologia di malattia, mentre in pazienti affetti dalla forma SMPP, il farmaco non si è dimostrato efficace[71]. Eventi avversi comuni sono quelli corrispondondenti al momento dell'infusione (brividi, cefalea, nausea, febbre, fatica, prurito e faringodinia); non sono riportate infezioni opportunistiche se non, purtroppo, quella da JCV con lo sviluppo di PML. Sfortunatamente, dato che la licenza per il rituximab è scaduta nel 2013 (2016 negli USA), non sono previsti al momento studi di fase III.

Ocrelizumab

L'Ocrelizumab è un anticorpo umanizzato con lo stesso meccanismo d'azione del Rituximab. Il recupero della linea B è però più rapido e si completa in circa 3 mesi. Ad oggi, un solo studio di fase II è stato condotto e ha valutato la

somministrazione di di Ocrelizumab (600 o 2000 mg ev al giorno 1 e 15) contro Avonex per 6 mesi. Al sesto mese tutti i pazienti hanno ricevuto Ocrelizumab 600 mg ev (tranne i pazienti che avevano ricevuto 2000 mg al tempo 0, che hanno ricevuto in questo caso 1000 mg). Tale somministrazione è stata poi ripetuta ad 1 e 2 anni. Nei primi 6 mesi i pazienti trattati con Ocrelizumab hanno sviluppato meno lesioni captanti alla RM. I risultati dei due identici studi di fase III contro Rebif 44 (*Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*-OPERA 1 e 2) sono stati recentemente pubblicati dimostrando una riduzione rispetto ad interferon del tasso annualizzato di ricaduta del 46 e 47% rispettivamente. Gli effetti avversi sono quelli legati al momento dell'infusiuone e già descritti per il rituximab; nel suddetti studi non sono state riportate infezioni opportunistiche.

Alemtuzumab

L'alemtuzumab è un anticorpo umanizzato, approvato dall'FDA e dall'EMA per il trattamento della leucemia linfocitica cronica. Il suo target è il CD52, una glicoproteina ampiamente espressa nel sistema immunitario (linfociti T, linfociti B, cellule Natural Killer, cellule dendritiche, la maggior parte di monociti e macrofagi, alcuni granulociti, ma non i neutrofili)[150]. La funzione di questa glicoproteina è ancora sconosciuta ma è stato suggerito un ruolo nella migrazione dei linfociti T e nella costimolazione[151-154]. L'Alemtuzumab potrebbe agire, una volta legato al CD52 come anticorpo attivante la CDC e la ADCC[151]. Il farmaco induce infatti una rapida (entro 1h) e severa deplezione linfocitaria che dura per molti anni[155]. Fortunatamente Alemtuzumab non si lega alle cellule ematopoietiche staminali ed ha una breve emivita, pertanto non è ancora chiaro, ad oggi, il motivo di questi effetti così a lungo termine (ripristino delle cellule B a 3 mesi e ripristino delle cellule T in 3-5 anni). Il farmaco è considerato una fonte drastica e duratura di immunosoppressione e quindi, potenzialmente da inserire in una finestra terapeutica molto precoce nelle forme aggressive di SM.

Nello studio di fase II CAMMS223[156], constro IFNβ-1a, l'alemtuzumab, a dosaggio di 12 o 24 mg (somm.ne ev per 5 gg consecutivi al baseline e poi per 3 gg consecutivi a 12 mesi), ha dimostrato a 36 mesi una riduzione della disabiltà sostenuta del 71%, del tasso di ricaduta del 74% e l'80% dei pazienti rimaneva relapse-free a 36 mesi contro il 52% dei trattati con INFβ. Risultati estremamente incoraggianti e simili sono derivati dagli studi di fase III CARE-MS1 e CARE-MS2. Nel primo, ad esempio, Alemtuzumab ha dimostrato di essere in grado di ridurre il *relapse-rate* annualizzato del 55% comparato a Rebif, il 78% dei pazienti trattati era inoltre *relapse-free* a 2 anni contro il 59% del gruppo di controllo; in RM a 2 anni ha ridotto il numero delle lesioni captanti (7 vs 19%), il numero delle lesioni in T2 (49 vs 58%) e lo sviluppo di atrofia cerebrale (40%)[157].

Il profilo di sicurezza definito dai 3 studi è stato lo stesso: frequenti reazioni all'infusione (cefalea, febbre, nausea, flushing), da correlarsi al massivo rilascio di citochine dopo la lisi cellulare, aumento del rischio di tumori maligni, aumento del rischio di patologie autoimmuni, in particolare tiroidite autoimmune ma anche popora trombocitopenica idiopatica, pancitopenia autoimmune e glomerulonefrite autoimmune.

Farmaci anti-citochine

Più difficile appare invece la creazione di farmaci interagenti con il sistema delle citochine. Le citochine infatti sono molecole dotate di diverse proprietà farmacologiche intrinseche e quindi rappresentano un difficile bersaglio terapeutico. Tuttavia una molecola appartenente a questa classe farmacologica che appare dai primi risultati pubblicati molto promettente è il *Daclizumab*, attualmente in fase di commercializzazione (Zinbryta).

Il daclizumab, largamente impiegato per prevenire il rigetto di trapianto allogenico, rappresenta oggi un ulteriore possibile farmaco per la SM. Sebbene il suo meccanismo d'azione debba ancora essere completamente definito, questo anticorpo monoclonale umanizzato blocca il CD25 che costituisce l'epitopo del recettore per IL-2 (IL-2R). Il razionale alla base dello sviluppo di questo anticorpo

è la soppressione della proliferazione della cellule T attraverso il blocco della formazione del complesso con IL-2R. Infatti, IL-2 gioca un ruolo importante nella regolazione della proliferazione dei linfociti. Tuttavia non è stato verificato il mantenimento di questa azione anche in vivo. Infatti si pensa che il reale meccanismo d'azione sia legato all'espansione reattiva di cellule regolatorie NK (*bright NK cells)*, che provocherebbero la citolisi del linfocita T. Il blocco funzionale del recettore ad alta affinità per l'IL-2 sul linfocita T da parte del daclizumab, permetterebbe a quello ad affinità intermedia sulla cellula NK di subire lo stimolo citochinico, provocando quindi l'espansione cellulare NK con proprietà citolitiche nei confronti delle cellule T autoreattive. Attualmente sono disponibili solo tre studi di fase II condotti in aperto che hanno valutato il ruolo di questo anticorpo nella SM. In due di questi[158,159], il daclizumab era somministrato come terapia aggiuntiva all'IFNβ, mentre il terzo[160] è stato condotto con lo scopo di dimostrare la sua efficacia come monoterapia rispetto alla terapia d'associazione con l'interferone. Questo studio ha mostrato risultati incoraggianti per ciò che riguarda la stabilizzazione dei pazienti con SMRR. Gli effetti collaterali segnalati dagli studi di fase II sono stati nausea, fatica, cefalea, ed infezioni opportunistiche. E' di recente conclusione lo studio multicentrico di fase III DECIDE (*Daclizumab compared to IFNβ-1a (Avonex) for RRMS*) per valutare l'efficacia del daclizumab a somministrazione sottocutanea contro Avonex, con il controllo del *relapse-rate* annuale come *endpoint* primario; i risultati non sono ancora stati pubblicati.

Farmaci per uso orale

Un approccio terapeutico di notevole importanza, soprattutto per quanto concerne il miglioramento della qualità della vita dei pazienti affetti da SM, è quello con le molecole somministrabili per via orale. Abbiamo già discusso precedentemente della Teriflunomide.

Fingolimod

Un'altra molecola appartenente a questa classe è il Fingolimod o FTY720, attualmente in commercio come Gilenya al dosaggio di 0.5 mg al giorni, tutti i giorni. I criteri AIFA di somministrazione del Gilenya sono gli stessi del Tysabri (vedi prima).

Questo farmaco presenta un differente meccanismo d'azione rispetto alle altre terapie sino ad ora disponibili. In vivo la molecola viene fosforilata a Fingolimod-fosfato, molecola che assomiglia molto alla sfingosina 1-P. La molecola agisce quindi come un antagonista non selettivo del recettore S1P (S1P1, S1P3, S1P4 e S1P5). A livello degli organi linfoidi secondari, il blocco del recettore S1P1 presente sui linfociti T e linfociti B riduce la loro mobilizzazione, determinando quindi un sequestro linfocitario reversibile in tali organi e prevenendo in tal modo la possibilità che le stesse cellule entrino all'interno del SNC e diano luogo alla cascata infiammatoria caratteristica della SM. Fingolimod è un farmaco innovativo, perchè a differenza degli immunosoppressori che causano distruzione delle cellule, in questo caso l'attivazione dei linfociti T e B rimane intatta[161].

Il Fingolimod ha dimostrato di essere in grado di ridurre lo sviluppo di nuove lesioni alla RM e di rallentare la progressione della malattia[162]. Entrambi gli studi FREEDOMS (*FTY720 research evaluating effects of daily oral therapy in MS*)[163] e TRASFORMS (*Trial assessing injectable interfern vs FTY720 oral in RRMS*)[164] hanno evidenziato l'efficacia del Fingolimod dimostrando una riduzione del tasso di ricaduta annualizzato di circa il 65%. La sorveglianza *post-marketing* ha messo in evidenzia nei pazienti trattati di un un maggior rischio di infezioni erpetiche, di cancro della pelle, di edema maculare, di lieve ipertensione e di aumento delle transaminasi. Il farmaco richiede un monitoraggio cardiaco alla prima somministrazione in quanto, per l'effetto su S1P1 e S1P3 sui miociti cardicaci, può indurre insorgenza di bradiaritmie. Tale effetto scompare dal secondo giorno in quanto tali recettori vengono internalizzati all'interno delle cellule rendendo vana l'azione del farmaco a livello cardiaco.

BG-12 (Dimetilfumarato)

Il BG-12, estere del dimetil fumarato (DMF), è già utilizzato da tempo in molti paesi per il trattamento della psoriasi. Le formulazione esterificate sono utilizzate per aumentare la biodisponibilità intestinale. Dopo assorbimento, la molecola è rapidamente idrolizzata a monometil fumarato (MMF), la forma metabolicamente attiva. Il meccanismo d'azione del DMF è molteplice[128]: a) effetto antinfiammatorio sul sistemo immunitario favorendo lo switch linfocitario a TH2, aumentando la produzione di IL-10 ed IL-1 *receptor antagonist* (IL-1RA) e riducendo la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali TNFα, IL-1β, IL-6 da parte di astrociti e microglia; b) effetto neuroprotettivo attraverso l'attivazione di Nrf-2 (fattore di trascrizione implicato nell'attivazione di meccanismi cellulari antiossidanti); c) favorisce l'apoptosi delle cellule T riducendo l'espressione di Bcl-2 ed infine d) riduce la migrazione dei linfociti T riducendo l'espressione di ICAM-1,VCAM-1 ed E-selectina sull'endotelio.

L'efficacia del farmaco è stata dimostrata in diversi studi clinici tra i quali lo studio DEFINE di fase III (*Determination of Efficacy and Safety of Oral Fumarate in RR MS*) che ha evidenziato che sia la somministrazione di 240 mg due volte al giorno che quella di 240 mg tre volte al giorno era superiore al placebo in termini di *outcomes* clinici e di RM[165]. Lo studio CONFIRM (*Comparator and an Oral Fumarate in RRMS*), sempre di fase III, ha messo a confronto la somministrazione quotidiana di 720 o 480 mg di Fumarato (2 o 3 somm.ni giornaliere da 240 mg) contro Copolimero e Placebo[166]. La riduzione del tasso di ricaduta annuale a 2 anni è stato del 51 e 44% rispettivamente con 720 e 480 mg contro il 29% del Copolimero; la riduzione percentuale nella comparsa di nuove lesioni in T2 fu rispettivamente di 73, 71 e 54%. D'altronte la riduzione in termini di progressione della disabilità a 3 mesi non ha mostrato differenze significative.

Gli eventi avversi descritti sono prevalentemente gastrointestinali con nausea, vomito, dispepsia, diarrea e dolore addominale (preferita l'assunzione dopo i pasti principali per minimizzare questi effetti) ma molto frequente è anche la comparsa di *flushing* (che insorge nei primi 30 minuti dalla somm.ne e recede

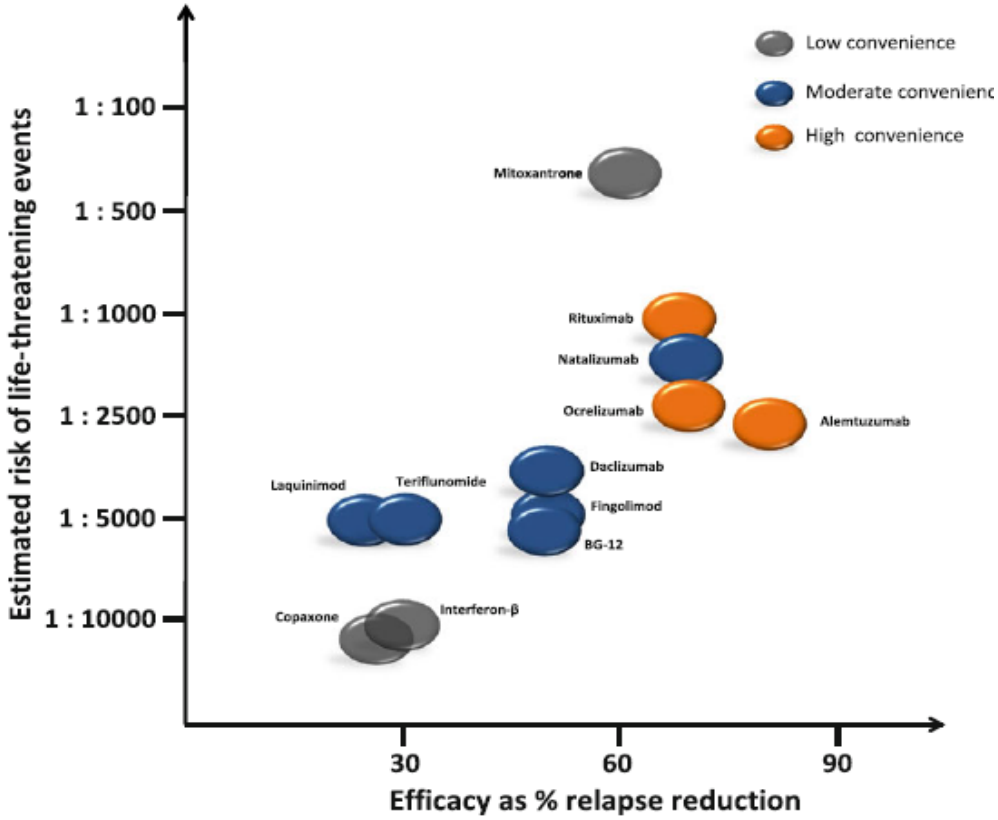
entro 90 minuti). Infine è segnalato un aumento delle transaminasi durante i primi 6 mesi. Sia lo studio DEFINE che lo studio CONFIRM hanno evidenziato come la conta linfocitaria si riduca progressivamente nel corso del primo anno di terapia, per poi stabilizzarsi (comunque a valori medi nel range di normalità). Il farmaco è in commercio con il nome di Tecfidera cp 120 mg e 240 mg (prima settimana 120 mg due volte al giorno per titolazione e poi 240 mg due volte al giorno).

Laquinimod

Il laquinimod è un recente farmaco immunomudolante orale. Dopo somministrazione laquinimod è rapidamente assorbito con pressocchè totale biodisponibilità. La molecola ha allo stesso tempo effetto antinfiammatorio e neuroprotettivo[167,168]. L'effetto antinfiammatorio si esplica attraverso l'inibizione della migrazione dei leucociti nel SNC tramite la riduzione di VLA-4, l'induzione di switch del CD4+ a TH2/3 ed infine tramite riduzione dell'attività trascrizionale NFκB (riduzione della sintesi di molecole chemotattiche e di adesione). L'effetto neuroprottettivo si esplicherebbe attraverso l'induzione della secrezione di BDNF. I risultati dello studio di fase III ALLEGRO (Assessment of Oral Laquinimod in preventing progression in MS) che ha comparato Laquinimod 0.6 mg/die e placebo, hanno evidenziato una riduzione molto modesta del tasso di ricaduta annuale (23%) e del rischio relativo di progressione della disabilità (36%). Molto modesti anche gli effetti sugli *outcomes* di RM[169]. Decisamente più di rilievo è stata la dimostrazione invece della capacità di laquinimod di ridurre lo sviluppo di atrofia cerebrale (circa 33%). Nello studio di fase III BRAVO (Laquinimod double-blind, placebo-controlled study in RRMS patients with a rater-blinded reference arm of IFNβ1a (Avonex)) purtroppo però la molecola non ha mostrato differenze in termini di relapse rate contro controllo[170]. I comuni eventi avversi descritti sono dolore addominale, dolore alla schiena e tosse; frequente anche il riscontro di rialzo delle transaminasi. Visti gli scarsi benefici, il farmaco non è stato commercializzato.

La figura 5 fornisce una illustrazione semplificata e riassuntiva del profilo di efficacia in termini di tasso di ricaduta annualizzato paragonato agli eventi evversi per ogni farmaco discusso e fornisce un'interpretazione in termini di convenienza di somministrazione considerando anche la via della somministrazione stessa. Infatti la riduzione del tasso di ricaduta è il più affidabile outcome di predizione di efficacia di un farmaco ed è, come abbiamo visto, utilizzato come marker di previsione in ogni trial clinico.

Figura 5. Efficia in termini di riduzione del tasso di ricaduta annualizzato vs tasso di evento avverso dei farmaci in commercio e di quelli in fase II/III per il trattamento della SM e loro grado di convenienza di somministrazione (Fonte: Ali R et al., Drugs 2013)[128].



Segue la tabella 5 che mostra una sintesi delle caratteristiche farmacologiche dei singoli trattamenti per la SM.

Tabella 5. Tabella riassuntiva delle caratteristiche dei trattamenti per la SM.

	Descrizione farmaco	*Farmacodinamica*	*Posologia e via di somministrazione (REFI 2006 125 /id)*	*Indicazioni d'uso*
IFN ß-1a: *Avonex*	Polipeptide naturale prodotto dai fibroblasti umani: IFNß1a è prodotto da CHO (chinese hamster ovary cells) ed è farmacologicamente identico a quello naturale; IFNß1b è prodotto da *E.Coli* e presenta piccole differenze rispetto alla forma naturale: non è glicosilato, Met1 è mancante e Cys17 è sostituito da Ser. Ha proprietà antivirali, antiproliferative e immunomodulatorie.	Legandosi a specifici recettori, attiva una cascata di segnali implicati a vari livelli del processo patologico della SM: 1)inibisce l'attivazione delle cellule-T; 2)inibisce l'attraversamento della BEE inducendo una diminuzione di IL-2, rilasciata a sua volta da enzimi degradanti la matrice; 3) determina una diminuzione della citochina proinfiammatoria IL-2 e l'espressione dei recettori per la stessa; 4) ha azione antagonista verso gli effetti dell'IFN-γ che ha azione proinfiammatoria; 5) induce un decremento della presentazione dell'antigene, riducendo l'espressione delle molecole co-stimolatorie e di MHC II sulle APCs; 6) inibisce la proliferazione delle cellule della microglia, che secernono enzimi proteolitici, radicali e citochine, implicati direttamente nel danno assonale, della mielina e della BEE	30 mcg/sett. i.m.	Indicato nella forma RRMS sia per ridurre la frequenza delle esacerbazioni cliniche, sia per rallentare la progressione della disabilità fisica[29] (L'Avonex è anche indicato per pazienti che hanno manifestato un singolo evento demielinizzante, se sono state escluse altre diagnosi e se c'è un alto rischio di sviluppare la SM clinicamente definita) [30].
Rebif 22			22 mcg x 3/sett. s.c.	
Rebif 44			44 mcg x 3/sett. s.c.	
IFN ß-1b: *Betaferon*			250 mcg a giorni alterni s.c.	Indicato nella forma RRMS per ridurre la frequenza delle recidive e nella SPMS in fase attiva della malattia[30].
glatiramer acetato	Sale acetato di un polimero sintetico costituito da: L-Ala, acido L-glutammico, L-Lys, L-Tyr in rapporto variabile.	Progettato come "imitatore" della mielina, fungendo così da esca per il sistema immunitario. Sono stati proposti diversi meccanismi: 1)determina il passaggio delle cellule T da un fenotipo Th1 a uno Th2, promuovendo la produzione di citochine anti-infiammatorie; 2)compete con la proteina basica della mielina (MBP) inibendone il legame con il MHC II, inducendo così la formazione di cellule T-glatiramer acetato specifiche con supposta azione antinfiammatoria e inibendo la proliferazione di cellule T-mielina specifiche o altre APCs.	20 mg/die s.c.	Indicato nella forma RRMS per ridurre la frequenza delle recidive in pazienti con basso grado di EDSS all'inizio del trattamento[30]. Utilizzato nei pazienti che non hanno mostrato un miglioramento, o sono intolleranti all'IFNβ1b; questo aspetto potrà essere meglio definito in seguito ad una comparazione con IFNβ1a e 1b[31].
natalizumab(Sweet 2007 128 /id)	Anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato che agisce come antagonista della α4 integrina.	Inibitore selettivo dell'adesione molecolare dei leucociti all'endotelio vascolare. Blocca quindi la migrazione leucocitaria nel tessuto infiammato causando una diminuzione dell'infiammazione.	300 mg/mese per lenta infusione i.v.	Approvato come monoterapia per il trattamento delle forme recidivanti della SM per quei pazienti che non hanno risposto adeguatamente, o sono intolleranti alle alternative terapeutiche della SM.
mitoxantrone	Derivato dell'antracendione correlato alle antracicline come la doxorubicina e daunorubicina. Ha proprietà immunosoppressive e immunomodulanti	1)si intercala al DNA determinando rotture della doppia elica; 2)interferisce con la sintesi dell'RNA; 3)inibisce la Topoisomerasi II esercitando effetti immunosoppressivi e antineoplastici; 4)interagisce con Cyt p450 reduttasi in presenza di NADPH producendo radicali attivi.	12 mg/m^2 ogni 3 mesi per infusione i.v.	Indicato nei "pazienti ambulatoriali" per il trattamento della forma SPMS con o senza attacchi intermittenti e in fase attiva della malattia[30].
azatioprina	Profarmaco della 6-mercaptopurina	Inibisce la proliferazione dei linfociti mediante il blocco della sintesi delle purine, agendo così nella fase di sintesi del DNA (S) del ciclo cellulare.	1-3 mg/kg/die per os	Non autorizzati per il trattamento della SM, bensì utilizzati "*off-label*" in un ristretto numero di pazienti, sia con decorso moderato che severo, o con frequenti ricadute.
ciclofosfamide	Derivato delle mostarde azotate	Alchilante del DNA, in particolare della guanina in posizione 7 N. Entra nella cellula dopo l'idrossilazione da parte delle monossigenasi a funzione mista Cyt p450-dipendente, determinando l'anomalo appaiamento dei nucleosidi, la loro delezione e la formazione di legami crociati del DNA.	da 2 mg/kg/die a 80-100 mg/kg/die per os o e.v.	
metotrexato	Antagonista dell'acido folico	Blocca la produzione del folato ridotto, importante cofattore della timidina sintetasi e della glicinamide ribonucleotide sintetasi: impedisce quindi la produzione di nucleosidi per il DNA e RNA, agendo esclusivamente durante la fase S.	7,5-20 mg/settimana per os, e.v., i.m.o per via intratecale	

	Studi di efficacia *(++ ampia documentazione in letteratura,* *+ discreta documentazione,* *- scarsa documentazione, -- assente documentazione)*	*Principali reazioni avverse* (Wingerchuk 2006 33 /id)	*Anno di approvazione in Italia* (EMEA 2007 135 /id)	*Costo annuo di terapia per paziente in €*
IFN ß-1a: *Avonex*	(++) La sua efficacia è stata dimostrata nella riduzione del rischio di ricadute e nel rallentare la progressione della disabilità in RRMS; effetti significativi sono stati evidenziati nel diminuire la probabilità di sviluppo della SM clinicamente definita in pz che hanno mostrato un primo evento demielinizzante[31]	Sintomi simil-influenzali (mialgia, affaticamento, malessere generalizzato, mal di testa e febbre); Reazioni al sito di iniezione (eritema, dolore, gonfiore, e lesione alla cute); Disturbi comportamentali (depressione e tentativi di suicidio); Fenomeni autoimmuni (sviluppo di anticorpi anti-tiroide,contro antigeni nucleari e muscolari, disfunzioni tiroidee e epatiche, miastenia gravis, lupus eritematosus sistemico); Comparsa di anticorpi neutralizzanti (NAbs).	1997	~16.100
Rebif 22			1998	~15.600
Rebif 44				~21.000
IFN ß-1b: *Betaferon*	(++) Il farmaco si è dimostrato efficace nel diminuire la frequenza delle esacerbazioni, aumentare il tempo della prima ricaduta, rallentare l'aumento dell'area totale delle lesioni valutata all'MRI in pazienti con RRMS; effetti significativi si sono osservati nella riduzione del valore di EDSS, del tasso di ricadute e del volume delle lesioni all'MRI in SPMS[31].		1995	~16.300
glatiramer acetato	(++) Il farmaco ha riportato significativi miglioramenti nella riduzione della frequenza di ricadute nei pz con RRMS, specialmente in quelli con minima disabilità neurologica all'inizio del trattamento; effetti significativi sono stati evidenziati nella riduzione dello sviluppo di nuove lesioni T-1 in accrescimento riportate all'MRI[31].	Reazioni al sito di iniezione (dolore, eritema e indurimento della pelle); Reazioni idiosincrasiche meno frequenti (vampate, dispena, palpitazione e ansia); Altre reazioni che compaiono in seguito ad una terapia prolungata (lipoatrofia, linfoadenopatia e alterazione dei parametri ematologici e epatici).	2002	~15.700
natalizumab (Sweet 2007 128 /id)	(+) Il farmaco si è dimostrato efficace nel diminuire l'accrescimento delle lesioni e la formazione di nuove ma non ha mostrato effetti sul recupero clinico delle esacerbazioni acute o nella variazione del tasso di ricadute.	I pazienti immuno-compromessi presentano un alto rischio di sviluppare la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML). Altri effetti avversi: emicrania, fatica, infezioni del tratto urinario, depressione, artralgia e infezioni del tratto respiratorio.	1° approvazione 2004; riapprovazione 2006	~32.200
mitoxantrone	(+) Il farmaco è risultato efficace nel ridurre la frequenza delle ricadute e la disabilità neurologica in pz con SPMS ma anche in pz con RRMS in peggioramento[31].	Cardiotossicità in seguito a captazione dal farmaco da parte dei miociti e formazione di chelati con il ferro; Alterazioni ematologiche (leucopenia, neutropenia, anemia e trombocitopenia); Infezioni del tratto urinario; nausea; amenorrea; alopecia.	>20 anni	~1.300 (calcolata considerando un adulto di 1,8 mq)
azatioprina	(-) Il farmaco si è dimostrato efficace nel ridurre la frequenza delle ricadute ma non è chiaro se questo beneficio clinico prevale sul rischio di tossicità[31].	Alterazione del metabolismo epatico (colestasi); Nausea, vomito, anemia aplastica, ulcerazioni delle mucose; Raro rischio di neoplasie	>20 anni	~100-500
ciclofosfamide	(-) Alte dosi di Cyc in terapia combinata con ACTH hanno riportato una stabilizzazione nella SM progressiva; dosi pulsanti di Cyc ad intervalli mensili sono state valutate per il trattamento della forme progressive ma il regime della terapia risulta essere troppo tossico per una terapia a lungo termine per pz con SM; inoltre trattamenti mensili di Cyc hanno riportato benefici nel trattamento della RRMS ma non sono statisticamente significativi[31].	Alopecia, cistite emorragica; Nausea, vomito, anemia aplastica; Raro rischio di neoplasie	>20 anni	~200 (calcolato per il dosaggio minimo, x os)
metotrexato	(-) La terapia con il metotrexato ha mostrato un rallentamento della progressione della malattia nella SPMS.	Polmonite, cirrosi; Nausea, vomito, anemia aplastica; Raro rischio di neoplasie	>20 anni	~1.600-3.900 (calcolato x e.v.)

Capitolo 2 – La risonanza magnetica nella Sclerosi Multipla

Le tecniche di RM convenzionale sono solo in grado di valutare una piccola frazione delle anomalie patologiche del SNC in corso di SM, ad esempio non danno alcuna informazione circa le caratteristiche della sostanza bianca normalmente apparente (NAWM) o della sostanza grigia, se non indirettamente in questo ultimo caso, in termini di atrofia. Del resto la definizione di NAWM è proprio basata sul riscontro patologico che quelle aree cerebrali da sempre considerate "sane" alle tecniche convenzionali di RM (T1 e T2/FLAIR) (cioè le regioni al di fuori della placca demielinizzante) sono in realtà, come già discusso in precedenza, coinvolte da estensivi processi patologici come iperplasia gliale, edema, infliltrati infiammatori, assottigliamento della mielina e perdita assonale[171,172]. Inoltre, la sostanza grigia è anch'essa da tempo nota per essere sede di fenomi infiammatorio-degenerativi, e grazie all'introduzione di sequenze oppurtanamente dedicate allo studio delle lesioni intracorticali (in particolare la sequenza *Double Inversion Recovery*-DIR), il panorama patologico si è ulteriormente arricchito in quanto anche la sostanza grigia normalmente apparente (NAGM) è dimostrata essere sede di anomalie microscopiche non dissimili da quelle della NAWM[171,173,174]. Lo scenario delle tecniche di RM si è quindi progressivamente arricchito, grazie proprio alla necessità di esplorare queste aree, routinariamente appunto non caratterizzabili con le tecniche convenzionali. Focalizziamo ora la nostra attenzione su queste ultime per poi discutere nello specifico le cosiddette tecniche non convenzionali.

Ruolo delle tecniche convenzionali nella diagnosi e nel monitoraggio

La RM utilizza potenti campi magnetici ed energia a radiofrequenza per produrre immagini del SNC con un ottimo livello di dettaglio anatomico. La capacità quindi di valutare il cervello ed il midollo spinale (*spinal cord*-SC) in modo del tutto non invasivo ha quindi influenzato in maniera significativa l'approccio clinico alla diagnosi ed al trattamento della SM. L'evoluzione dei criteri diagnostici per la SM riflette del resto la crescente importanza delle immagini di RM nello stabilire la probabilità di diagnosi definita, ad oggi infatti, come già descritto precedentemente, le neuroimmagini sono utilizzabili per dimostrare sia la disseminazione nello spazio che quella nel tempo[110,111]. Inoltre la presenza di lesioni con caratteristiche tipiche di RM al momento di un evento clinico isolato, permette al clinico di stratificare i pazienti come a basso o alto rischio di conversione a SM definita[175,176]. Infine, tutte le attuali terapie approvate per il trattamento della SM hanno dimostrato la capacità di ridurre il numero ed il volume delle lesioni nella sostanza bianca nelle sequenze convenzionali[177-182] ed i neurologi clinici utilizzano di routine la RM nel corso del monitoraggio del paziente SM allo scopo di valutare l'efficacia del trattamento e la progressione di malattia.

La RM convenzionale dell'encefalo e del midollo spinale include l'utilizzo di sequenze che producono una varietà di contrasti tissutali che riflettono la diversa risposta dei protoni nelle diverse macromolecole. In generale un protocollo standard di RM prevede sequenze T1-pesate (T1-w), T2-pesate (T2-w) [generalmente fast spin-echo], a densità protonica (DP) e post-contrasto. Le immagini T1-w (spin-reticolo) producono immagini in cui il tessuto adiposo appare molto intenso e l'acqua molto poco intensa, ciò fornisce un ottimo contrasto tra la SG e la SB. Nelle immagini T2-w (spin-spin) il comportamento è opposto, pertanto i i processi patologici associati ad edema appariranno iperintensi. La sequenza FLAIR (*fluid-attenuated inversion recovery*) è una sequenza T2-w con l'aggiunta di un impulso di inversione in radiofrequenza che

annulla il segnale acquoso del LCS che riempie gli spazi ventricolari e subaracnoidei ed aumenta pertanto il contrasto delle lesioni periventricolari e iuxtacorticali (tuttavia risulta meno sensibile della T2 convenzionale o della DP in fossa cranica posteriore ed a livello midollare). Del resto è dimostrata la consistenza delle immagini FLAIR nella quantificazione del volume e del numero di lesioni per la determinazione nei trials clinici dell'efficacia di un farmaco[183]. Le immagini T2 o FLAIR ottenute sul piano sagittale sono specialmente utili per dimostrare il coinvolgimento del corpo calloso e la presenza di lesioni lungo le "digitazioni di Dawson" (lesioni parallele al sistema venoso penetrante l'encefalo)[184]. Entrambe sono caratteristiche tipiche delle lesioni demielinizzanti e quindi utili nello stabilire diagnosi di SM[185]. Le sequenze T2 quindi sono le più sensibili per riconoscere le placche, ma non sono in grado di differenziare le lesioni acute da quelle croniche poichè entrambe appaiono iperintense, benchè le croniche abbiano, in genere, una minore intensità di segnale. L'iperintensità è, infatti, dovuta ad un relativo aumento del contenuto in acqua, che è tuttavia aspecifico, perchè può essere secondario a processi patologici diversi: all'infiammazione e all'edema, caratteristiche della fase acuta, ma anche alla demielinizzazione e alla gliosi, alla degenerazione walleriana e alla perdita assonale, caratteristiche della fase cronica.

Altrettanto utili nello stabilire la diagnosi di malattia e nel monitoraggio dell'effetto di un DMD è l'acquisizione delle immagini T1 post-contrasto endovenoso di Gadolino (*Gadolinum based constrast agents*-GBDA). I GBDA infatti cuasano accorciamento del T1 e pertando appaiono come iperintensi nelle sequenze T1-w. Nei casi in cui, a causa di rottura della BEE, i GBDA fuoriescano dal lume vasale ed impregnino il parenchima cerebrale, tali regioni appariranno come aree patologiche di *enhancement*. La presenza di lesioni Gd+ è utile nella diagnosi di SM[110,111] e nel valutare a breve termine l'attività di malattia[186]. Infatti, a differenza delle immagini T2, la presenza di lesioni Gd+ è un segno di recente formazione della placca, la quale evidenzia capacità captanti per un periodo variabile tra le 6 e le 8 settimane[187]. Poichè il potenziamento dopo GBDA è

causato dalla flogosi e non si riscontra nella placca neoangiogenesi, edema vasogenico perilesionale e/o necrosi, il potenziamento può essere lieve e talvolta assente; quando presente, può essere nodulare o ad anello, completo od incompleto. Il primo aspetto è il più frequente ed è tipico delle placche con evidente infiammazione e moderata perdita di mielina. L'aspetto ad anello aperto, di spessore variabile e con un centro pseudonecrotico/pseudocistico, è specifico delle lesioni di grandi dimensioni, caratterizzate da infiammazione periferica e demielinizzazione completa.

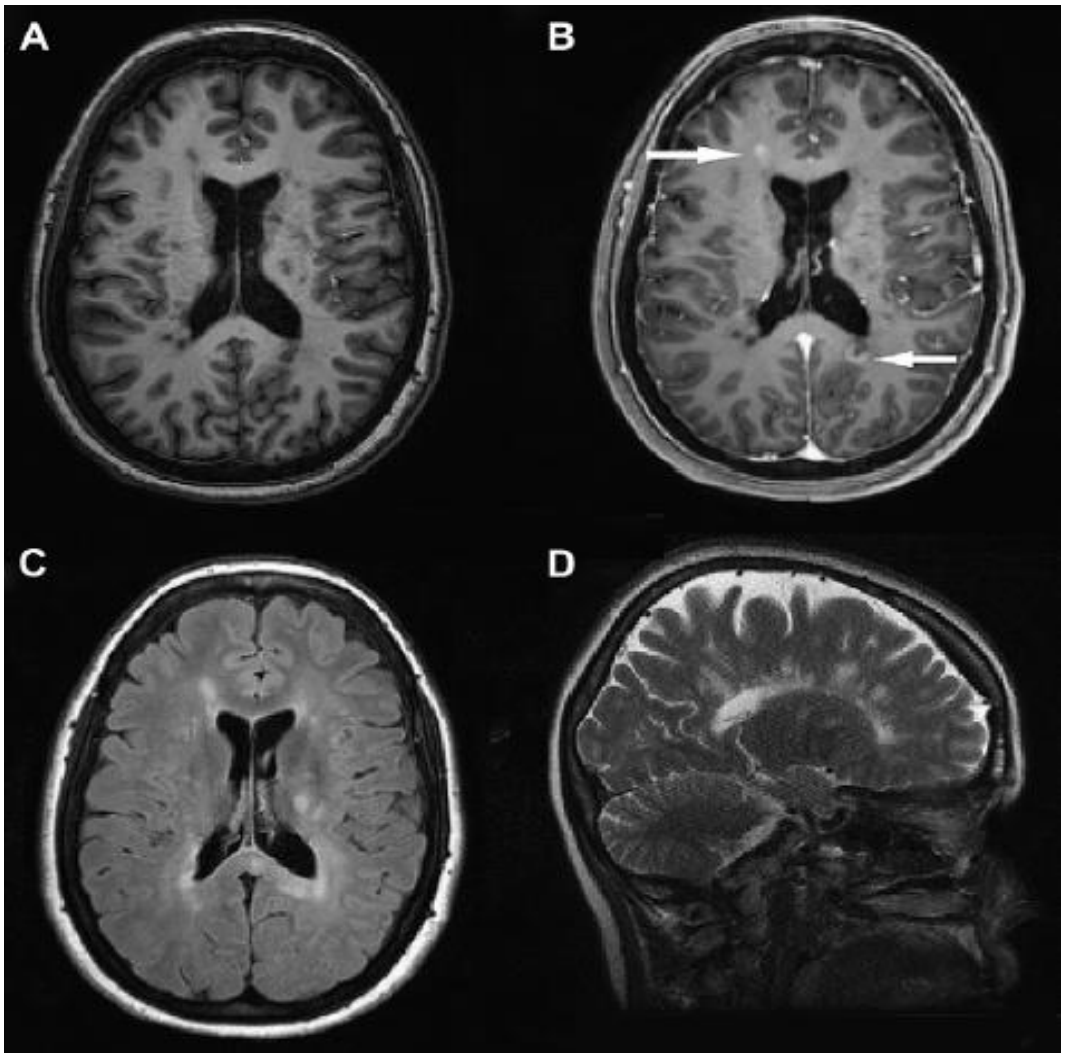
Se da un lato le tipologie di sequenze sono le stesse, le sequenze possono variare di molto tra i diversi centri di neuroradiologia, in relazione ai tempi necessari per l'acquisizione delle immagini, dei costi e del modello dello scanner. Il *Consortium of MS Centers* ha sviluppato quindi un protocollo standardizzato di acquisizione ai fini della diagnosi e monitoraggio clinico del paziente SM. Il campo magnetico dovrebbe essere di almeno 1.5 T e le *slices* di 3 mm ottenute con angolo standard senza l'applicazione di *gap*[184].

Come già accennato, le lesioni di SM sono tipicamente ritrovate nella SB con l'utilizzo di sequenze T2-w, specialmente la FLAIR, hanno forma ovoidale, sono perpendicolari all'asse maggiore dei ventricoli nel piano assiale, o appaiono come colonne longitudinali nel piano sagittale. Sono spesso circondate da un alone iperintenso più sfumato dovuto all'edema vasogenico (aspetto *lumpy bumby*). Generalmente hanno dimensioni > 3mm e quindi decisamente più voluminose delle lesioni puntiformi aspecifiche della SB dei pazienti con fattori di rischio cerebrovascolari od emicranici. Chiaramente accanto alle classiche lesioni periventricolari, tipiche di SM sono anche le lesioni a localizzazione iuxtacorticale, infratentoriali e spinali[185]. Infatti da non dimenticare come le diverse modifiche ai criteri diagnostici di malattia abbiano progressivamente proprio dato enfasi alle lesioni spinali, presenti in maniera variabile nel 50-90% dei pazienti[109]. Tuttavia è comunque più frequente il riscontro preferenziale di placche nei nervi ottici, nel tronco dell'encefalo, nelle regioni periventricolari,

nella capsula interna, nel corpo calloso (soprattutto nella porzione adiacente ai ventricoli laterali) e nella sostanza bianca sottocorticale. Nelle fasi avanzate di malattia, le lesioni tendono a divenire confluenti a livello periventricolare, interessando estesamente i centri semiovali e la corona radiata con confini mal delineabili (*dirty appearing white matter*). L'interessamento dei nervi ottici in corso di SM è molto frequente ed è spesso possibile documentare in corso di NORB l'iperintensità del nervo ottico in T2 con corrispettivo potenziamento dopo GBDA. Tuttavia l'uso di immagini coronali sottili con soppressione del grasso (*short time inversion recovery*-STIR o tecniche simili) è il modo più sensibile per evidenziare la presenza di lesioni acute. Inoltre in fase cronica, nelle sequenze T1-w, è possibile spesso riconoscere l'atrofia del nervo.

Se l'acquisizione T1 post contrasto, come detto, è necessaria per l'individuazione di recente attività di malattia, anche le sequenze T1 precontrasto sono utili e dovrebbero sempre essere esaminate per la possibile presenza di "buchi neri"[188]. I buchi neri sono aree di scarso segnale all'interno della SB e rappresentando quelle lesioni in T2 che sono caratterizzate da maggiore distruzione tissutale e perdita assonale[189], sono stati proposti quindi come un potenziale marker di neurodegenerazione[190]. Da sottolineare, però, che anche le recenti lesioni attive al Gd hanno spesso un parziale carattere ipointenso in quanto ricche in edema. In effetti solo poche di queste evolveranno verso *black holes* cronici (*cronic black holes*-CBHs) mentre la maggiorparte andranno in risoluzione entro i 6 mesi dall'esordio[191]. Quindi i pazienti con maggior propensione alla formazione di CBH avrebbero minori capacità di riparo del danno infiammatorio e potrebbero essere identificati come quelli a maggiore rischio di progressione della disabilità[192]. Nella figura 6 e nel box 3 un esempio di RM encefalo in paziente affetto da SM.

Figura 6. RM encefalo convenzionale in SM.



Box 3. RM encefalo convenzionale in SM.

(A) Muliple ipointentensità (buchi neri) in imagine assiale T1 senza GBDA. Da notare lo slargamento dei ventricoli e lo spianamento dei solchi. (B) Dopo somm.ne di GBDA, evidenza di lesioni in fase di attività con rottura di BEE. Da notare come entrambe le lesioni indicate siano ipointense in T1 pre-contrasto. (C) FLAIR assiale con le tipiche lesioni periventricolari. (D) Immagine T2 sagittale con le tipiche aree di demielinizzazione perivernosa ("digitazioni di Dawson").

Più del 90% dei pazienti SM mostrano coinvolgimento del midollo spinale all'autopsia ed in effetti la RM convenzionale evidenzia un coinvolgimento spinale nel 50-90% dei casi, con una predilezione per la regione cervicale[193,194]. Probabilmente suddetta variabilità dipende non solo dalle popolazioni di pazienti

studiate, ma anche dal fatto che la valutazione RM della corda midollare è alquanto complessa, sia per le piccole dimensioni della regione in studio, sia per la notevole quantità di artefatti che si possono sviluppare durante l'acquisizione delle immagini, legata non solo al movimento del collo, ma anche a deglutizione, respirazione e ciclo cardiaco[174,195,196-198].

Come noto dall'anatomia, il midollo spinale è una regione del SNC relativamente ridotta in dimensioni, costituita esclusivamente da fasci di conduzione, priva di strutture associative, e quindi potenzialmente, qualora sottoposta a danno, molto più invalidante, in particolare da un punto di vista motorio, della patologia encefalica.

Nel midollo spinale le lesioni sono tipicamente asimmetriche e si localizzano in sede cordonale posteriore e laterale, con un coinvolgimento parziale sul piano trasverso; il coinvolgimento longitudinale è generalmente poco esteso (di solito meno di due mielomeri). Inoltre le lesioni spinali difficilmente rispettano i confini dei compartimenti SB e SG, spesso nelle sequenze assiali è infatti facile individuare lesioni di confine[199-201].

Non è delineato, ad oggi, se esista o meno un rapporto definibile, in termini di probabilità di sviluppo, tra il numero di lesioni spinali ed il numero di lesioni cerebrali. Se in diversi studi *cross-sectional* infatti una chiara correlazione non è stata definita, alcuni studi longitudinali hanno tuttavia suggerito un rapporto di circa 3 ad 1[202].

Le lesioni demielinizzandi del midollo spinale sono tipiche nella regione cervicale, ma possono essere anche ritrovate a livello toracico e nel cono[203], e sono con maggiore sensibilità individuabili sul piano assiale, anche se sicuramente con maggiore difficoltà rispetto a quelle encefaliche. In corso di SMPP, il cui decorso è caratterizzato spesso proprio da una progressiva mielopatia in assenza di ricadute cliniche (quindi con scarsa attività dimostrabile alle T1 post-contrasto), è fondamentale la monitorizzazione del paziente tramite RM spinale[204]. In questa forma di malattia le lesioni si configurano come aree diffuse di moderata

iperintensità di segnale in T2, a differenza delle forme SMSP che evidenziano lesioni focali ad alta intensità, spesso peraltro confluenti[205].

Da ricordare come le sequenze *fast short-tau inversion recovery* (fast-STIR), generando un migliore contrasto lesionale nel midollo cervicale[206], abbiano dimostrato di essere in grado di evidenziare circa il 66% in più di anomalie spinali rispetto alle classiche immagini T2-w[207].

Infine, a differenza delle lesioni della SB che, per tutti i fenotipi di malattia, si localizzano appunto prevalentemente a livello cervicale, le lesioni demielinizzanti della SG sono equalmente distribuite a tutti i livelli spinali[208].

Caratteristiche sono le lesioni di una condizione patologica che si può porre in diagnosi differenziale con la SM nota come neuromielite ottica o malattia di Devic (NMO). Le lesioni di questa patologia sono tipicamente a localizzazione spinale, sono lunghe sul piano assiale almeno 3 metameri, spesso si accompagnano ad edema e captazione di contrasto. Il quadro spinale si associa classicamente al ricorrere di NORB, spesso bilaterale e sincrona[209]. In caso di sospetta NMO è importante la ricerca su siero o su liquor di anticorpi anti aquaporina-4, caratteristici della patologia[210,211]. Ad oggi comunque è dimostrato il non esclusivo coinvolgimento del nervo ottico o del SC in corso di NMO, frequentemente è possibile infatti anche riscontrare lesioni attorno al IV ventricolo o nelle regioni ipotalamiche, aree ricche in aquaporina-4[209,212,213].

Come già accenato, dato che anche la SG contiene mielina (per la presenza di assoni mielinizzati nella corteccia e nei gangli della base), in corso di SM anche questa può essere interessata dallo sviluppo di placche (vedi dopo, *lesioni corticali*).

Da sempre la forma remittente-recidivante di SM è stata definita come quel fenotipo di malattia che si configura clinicamente con la formazione ricorrente di placche demielinizzanti, potenzialmente manifeste da un punto di vista clinico.

Come già discusso precedentemente, la ricaduta clinica, per definizione, è spontaneamente autoremittente (ciò probabilmente è legato a meccanismi di autoregolazione a carattere antinfiammatorio) ma può lasciare esiti clinici permanenti più o meno gravi legati al danno locale mielinico ed assonale. È proprio il sommarsi di questi esiti clinici che da sempre è stato descritto come causante la disabilità accumulata del paziente RR. Diverso è il caso delle forme SP, nelle quale la progressiva assono-degenerazione legata alla cronica demielinizzazione della fase remittente è imputata come causa del progressivo peggioramente clinico del paziente. La forma PP è un fenotipo particolare di SM, in cui per motivi non del tutto noti, si instaurerebbero meccanismi patologici diffusi nel SNC (ma con predilezione della corda midollare) che avrebbero un prevalente carattere degenerativo del neurone come le forme SP, senza peraltro appunto una prima fase "infiammatoria" che possa spiegare l'instaurarsi di una secondaria sofferenza dell'assone in seguito alla demieninizzazione.

Da qualche anno, d'atronde, si è affermato il concetto che la SM sia a tutti gli effetti una patologia *precocemente* diffusa del SNC, dove quindi le "placche" rappresenterebbero solo un epifenomeno visibile alle convezionali metodiche di RM. Infatti, come già discusso precentemente, la neuropatologia su reperti autoptici ha dimostrato come l'attivazione dei meccanismi di immunità innata (con particolare riferimento al ruolo della microglia), la successiva infiltrazione linfociaria ed il danno cellulo- e complemento- mediato della mielina, siano in effetti processi che si instaurano diffusamente nel SNC, non solo nella sostanza bianca ma anche nella sostanza grigia. Tali processi sono tipici delle forme *progressive* di malattia e ciò potrebbe in effetti spiegare la diffusa assonodegenerazione caratteristica di questi fenotipi, in particolare della forma PP dove, appunto, la sofferenza assonale non è rimandabile ai convenzionali esiti gliali post-placca. Infine, del tutto recentemente, e già discussa precedentemente, è l'evidenza di formazioni simil-linfoidi nelle meningi dei pazienti secondariamente progressivi, potenzialmente causa, almeno in parte, della formazione delle placche nella SG ed anche la degenerazione neuronale

della NAGM. Questi meccanismi *diffusi*, particolarmente nelle forme progressive, confermati del resto dalle cosiddette tecniche non convenzionali di RM (vedi dopo) potrebbero chiarire quindi perchè spesso ci si trovi di fronte a pazienti che presentano un quadro clinico molto grave senza un concomitante carico lesionale (placche) correlabile e che peggiorano senza accumulare nuove lesioni (paradosso clinico-radiologico[214]). Almeno tre potrebbero essere le ragioni in grado di spiegare suddetta evidenza[215]. In primo luogo alcune lesioni potrebbero non essere evidenziate alle convenzionali sequenze T2-w. In secondo luogo, le sequenze T2-w mancano di specificità per l'eterogeneo spettro di processi patologici che si sviluppano all'interno della lesione. Infatti, essendo esclusivamente sensibili all'aumento del contenuto d'acqua, la visualizzazione di una lesione in immagine T2 non da alcuna informazione sulla tipologia di processo patologico presente al suo interno, dato che l'incremento del contenuto idrico può sottendere edema, demielinizzazione, remielinizzazione, gliosi reattiva e perdita assonale; queste chiaramente sono tutte modalità patologiche potenzialmente associate con deficit neurologici di grado diverso. In terzo luogo, le immagini T2-w non danno alcuna informazione su quello che accade al di fuori della lesione nel tessuto normalmente apparente.

Nelle forme recidivanti-remittenti al contario, è molto dibattuta la reale significatività clinica dei fenomeni patologici diffusi[215].

La scarsa correlazione, appunto, del carico lesionale della SB con gli indici di disabilità clinica, ha indotto la ricerca a individuare altre misure di RM in grado di spiegare suddetto paradosso. Secondo cardine della patologia è quindi l'*atrofia*. Se la perdita assonale si configura anatomicamente nella progressiva riduzione dei volumi cerebrale e spinale e allo stesso tempo clinicamente nella disabilità permanente, a questo punto il parametro di RM potenzialmente utilizzabile per valutare quest'ultimo carattere è l'atrofia.

Con il decorrere della patologia, ebbene, è sempre più evidente lo sviluppo di atrofia cerebrale e spinale (tipicamente nelle forme progressive di malattia, più controverso il quadro spinale delle forme remittenti). Come nel caso delle lesioni

della SB, l'atrofia è espressione aspecifica di diversi processi patologici come demielinizzazione, degerazione assonale e neuronale e gliosi. *Se è probabile che le lesioni della sostanza bianca siano importanti nella genesi dell'atrofia, ad oggi sembrerebbe più determinante il ruolo delle diffuse anomalie patologiche della NAWM e della NAGM*[216,217]. Nel caso specifico però dell'atrofia corticale o comunque della sostanza grigia, chiaramente oltre al ruolo diretto delle placche intracorticali o intranucleari e del danno diffuso, è importante sottolineare la degenerazione walleriana assonale a partire dalla placca nella SB, seguita poi dalla morte del pirenoforo[218,219]. L'atrofia cerebrale è fortemente correlata con la disabilità, con la compromissione cognitiva ed con i disurbi psichiatrici[218,220,221]. Inoltre, cosa più significativa, il progressivo *impairment* fisico e cognitivo delle forme secondariamente progressive di malattia è maggiormente correlato con la riduzione del volume cerebrale che non con il carico lesionale della sostanza bianca[222]. Infatti è ben descritta la correlazione delle diverse modalità di valutazione dell'atrofia con l'EDSS[193,215,223-242]. Allo stesso modo la maggiorparte degli autori ha individuato correlazione tra l'atrofia cerebrale e spinale con il punteggio globale MSFC e con il punteggio parziale dedicato alla deambulazione (FTW) o alla mobilità dell'arto superiore (9-HPT); il punteggio cognitivo (PASAT) al contrario non è associato alla patologia spinale ma, non sorprendentemente, esclusivamente a quella encefalica[223,226,228,230,232,239,240]. Di rilievo è la dimostrazione nelle forme progressive di malattia di una maggiore correlazione tra i parametri clinici del paziente e l'atrofia spinale rispetto alla correlazione con la patologia cerebrale, ciò potrebbe indicare come sia proprio la patologia spinale a sottendere maggiomente il decorso clinico del paziente progressivo[226].
In effetti quindi è innegabile come l'atrofia possa essere considerato un ottimo biomarker surrogato di RM per la monitorizzazione del paziente SM, in particolare nelle forme progressive.

Da sottolineare, infine, come una riduzione del volume cerebrale sia chiaramente dimostrata a seguito del trattamento con corticosteroridi o terapie

immunomodulanti, probabilmente in relazione alla riduzione dell'edema causato dall'infiammazione (*pseudoatrofia*)[218,221,223,243,244].

La diffusa atrofia cerebrale è visualizzabile grazie all'allargamento dei ventricoli, allo spianamento dei solchi cerebrali, aspetti decisamente più evidenti alle immagini T1-w. A tale proposito, marker sensibile di atrofia cerebrale è lo slargamento del terzo ventricolo legato all'atrofia talamica[245], questa a sua volta è correlata all'*impairment* cognitivo del paziente SM[246]. Similmente l'ingrandimento dei corni temporali è espressione di perdita cellulare nelle strutture profonde del lobo temporale, in particolare dell'ippocampo, ed è associato con la compromissione della memoria verbale[247]. A livello cerebrale il tasso di atrofia per anno nel paziente SM è di circa lo 0.8%[248-250].

Attraverso sistemi di misurazione manuale, semi-automatici ed automatici è possibile studiare i volumi delle strutture cerebrali, quali sostanza grigia, sostanza bianca e strutture sottocorticali. Questo consente di valutare l'atrofia in termini di riduzione di volume. I metodi manuali sono basati sulla segmentazione delle strutture oggetto di analisi da parte dei singoli operatori, per cui lo svantaggio di questi metodi risiede nella loro scarsa riproducibilità. I semi-automatici, rispetto ai primi, presentano una riproducibilità intermedia, comunque non ottimale. I metodi automatici sono i più largamente utilizzati e consentono di quantificare l'atrofia con un approccio globale o regionale. Le immagini su cui questi sistemi automatici sono generalmente applicati, per meglio identificare i minimi cambiamenti dell'atrofia, sono le acquisizioni volumetriche isotropiche ad alta risoluzione T1-3D. Si tratta di tecniche riproducibili basate su approcci di registrazione e segmentazione. Due delle tecniche basate sulla registrazione più utilizzate sono la *brain boundary shift integral* (BBSI) e la *structural image evaluation using normalization of atrophy* (SIENA). Queste misurano i cambiamenti del volume cerebrale totale, quindi l'atrofia della sostanza bianca e grigia in combinazione. D'altra parte, le tecniche di segmentazione consentono di quantificare la sostanza grigia totale o regionale e i volumi di sostanza grigia corticale e profonda. Tra le più comunemente

utilizzate si annovera la *Voxel-Based Morphometry* (VBM). La VBM effettua, in particolare, una misura del volume cerebrale attraverso una serie di passaggi automatici, consentendo una caratterizzazione neuroanatomica in base alla composizione locale dei diversi tessuti cerebrali. Innanzitutto, opera una normalizzazione di tutte le immagini ad uno stesso spazio stereotassico, registrando e adeguando ad uno stesso *template* ciascuna immagine, e correggendo le differenze morfologiche dell'encefalo globale. Quindi, esegue una segmentazione dei diversi tessuti (*grey matter*, GM; *white matter*, WM; *cerebro-spinal fluid*, CSF) con un successivo *smoothing* dei segmenti di sostanza grigia. A ciascun voxel viene infine assegnato un valore di intensità tra 0 e 1 correlato alla concentrazione locale del tessuto; successivamente, mediante trasformazione logaritmica, viene ricreata una distribuzione normale dei valori. Un modello generale lineare (GLM) infatti permette più agevolmente di investigare mediante analisi statistica possibili relazioni tra la sostanza grigia e specifici dati oggetto di studio. Tra i software basati sulla VBM, FIRST, strumento facente parte di FSL (FMRIB Software Library), è uno di quelli maggiormente impiegati per il calcolo dei volumi sottocorticali.

L'atrofia spinale è di norma valutata a livello cervicale, specialmente ai primi metameri, in quanto da un punto di vista tecnico è più alto in questa sede il contrasto con il liquor e meno probabile la genesi di artefatti legati a movimento, deglutizione e respirazione[223,230,251,252] ed inoltre, come già detto, la regione cervicale è quella del SC che presenta un maggior numero di lesioni. Diverse modalità tecniche sono state definite nel corso degli anni, ma sicuramente, come già discusso precedentemente, le sequenze tipicamente usate per i calcoli volumetrici del SNC sono quelle T1 pesate, in quando caratterizzate da migliore dettaglio anatomico e maggiore contrasto con il liquor. La classica metodica è stata definita da Losseff e colleghi e prevede la registrazione di 5 *slices* pseudoassiali di 3 mm di spessore usando il disco intervertebrale tra C2 e C3 come marker caudale, la misurazione quindi dell'area della sezione trasversale del midollo in mm^2 (*cross-sectional area*-CSA) ad ogni livello, ed infine il calcolo

del suo valore medio (*mean CSA*). In questo caso quindi la valutazione dell'atrofia spinale avviene tramite la misura indiretta della sezione trasversale del midollo[229].

Accanto alle classiche aree di ipersegnale in T2, i pazienti SM possono presentare infine anche regioni di ipointensità in T2, specialmente nelle strutture grigie profonde come il putamen, il globo pallido ed il talamo[253]. Da un punto di vista patologico queste aree sono correlabili al deposito di ferro espressione di neurodegenerazione[254], e quindi sono da considerarsi reperti più tipici delle forme progressive di malattia.

Recentemente si è molto discusso del concetto di sindrome radiologicamente isolata (RIS). Questa è una condizione che indica un quadro di RM compatibile con malattia demielinizzante in un soggetto peraltro sano che non ha mai avuto alcuna fenomenologia clinica, il reperto patologico RM è quindi un reperto del tutto occasionale[255]. Alcuni studi hanno in effetti dimostrato come, a 2 anni di osservazione, circa un soggetto su tre diventerà un paziente CIS e due su tre evidenzieranno un peggioramento del quadro di neuroimmagine[255,256]. La presenza di lesioni Gd+, lesioni a localizzazione spinale, o la presenza delle classiche anomalie liquorali è associata con una più rapida conversione a CIS o SM clinicamente definita[257,258]. Tuttavia, una quota sostanziale di questi soggetti resta asintomatica e/o clinicamente stabile, rendendo dibattuto il tema circa l'eventuale necessità di trattamento dei soggetti RIS.

In termini di prognosi, se le caratteristiche di RM alla diagnosi non si sono rivelate utili nella definizione di un fenotipo di malattia maggiormente aggressivo, una maggiore rapidità di accumulo di nuove lesioni nei primi 5 anni di decorso è stata associata con una maggiore disabilità a 20 anni[259]. Del resto è ben noto che i pazienti con una alta frequenza di ricaduta nei primi 5 anni hanno un maggiore rischio di disabilità a lungo termine. Infine, da sottolineare come

l'accumulo di lesioni sia un reperto tipico della prima fase "infiammatoria" di malattia, al contrario, nella fase progressiva, il carico lesionale resta spesso immodificato, a fronte di un progressivo accumulo di lesioni corticali e di sviluppo di atrofia[260-264].

Per ciò che concerne il monitoraggio della risposta alla terapia, il ruolo della RM è decisamente meno definito. Pertanto recentemente è stato creato uno *score*, il cosiddetto *score di Rio*[265], basato su caratteristiche cliniche e di RM, proprio allo scopo di guidare il neurologo nel determinare un paziente *non-responder* alla terapia con IFNβ, per poi quindi eventualmente modificarne il regime terapeutico. Recentemente lo score di Rio è stato modificato (tabella 6 e figura 7), aumentandone la sensibilità, proprio in particolare in base al numero di nuove lesioni accumulate in T2 dal paziente in un anno[266].

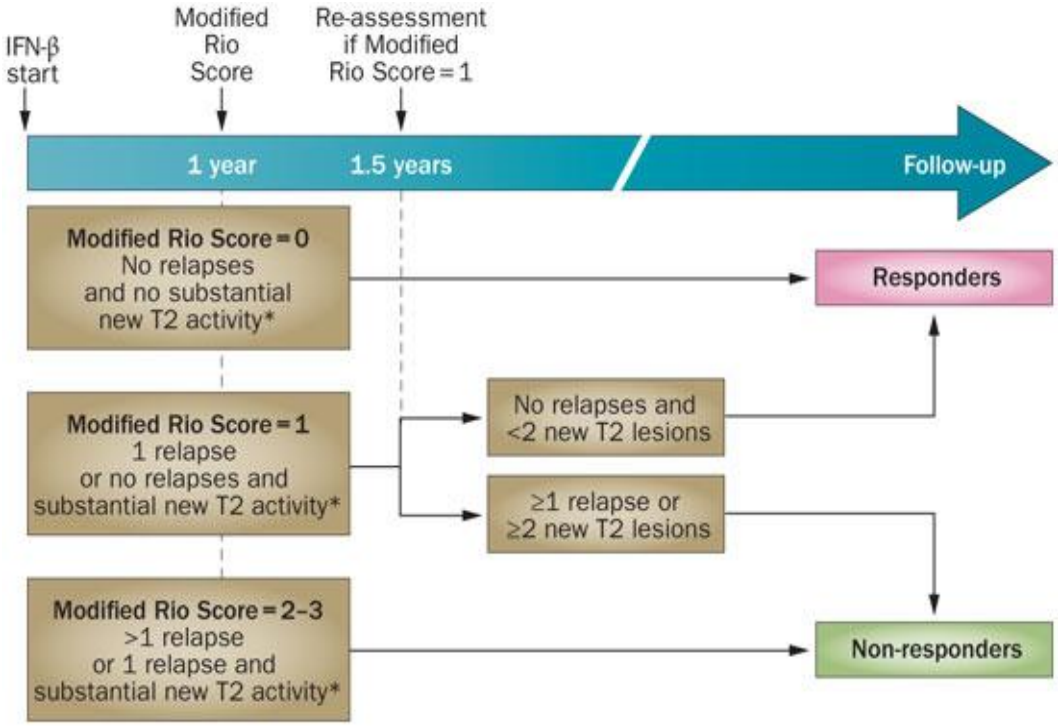
Tabella 6. Score di Rio e score di Rio modificato a confronto.

Table 2 | The Rio and Modified Rio Scores

Rio Score		Modified Rio Score	
Criterion	**Change over the first year**	**Criterion**	**Change over the first year**
MRI criterion = 0 MRI criterion = 1	≤2 active* T2 lesions >2 active T2 lesions	MRI criterion = 0 MRI criterion = 1	≤4 (5)‡ new T2 lesions >4 (5)‡ new T2 lesions
Relapse criterion = 0 Relapse criterion = 1	No relapses ≥1 relapse	Relapse criterion = 0 Relapse criterion = 1 Relapse criterion = 2	No relapses 1 relapse ≥2 relapses
EDSS criterion = 0 EDSS criterion = 1	Increase in EDSS score of <1 point Increase in EDSS score of ≥1 point, sustained over at least 6 months	Not included	Not included
Rio Score = MRI criterion + relapse criterion + EDSS criterion		Modified Rio Score = MRI criterion + relapse criterion	

*Active lesions defined as new or enlarging T2-weighted lesions plus gadolinium-enhancing lesions over the first year. ‡The cut-off of four lesions was in the validation set; the cut-off of five lesions was in the training set. Abbreviation: EDSS, Expanded Disability Status Scale.

Figura 7. Algoritmo proposto in base allo score di Rio modificato per la valutazione del rischio di progressione a 4 anni in pazienti SM trattati per 1.5 anni con IFNβ. *sostanziale nuova attività T2 è definita come > di 4-5 nuove lesioni in 1 anno di trattamento o > 1-2 nuove lesioni in T2 se la RM di controllo è stata eseguita ad almeno 6 mesi dall'inizio della terapia.



In sintesi, comunque, è chiaro come in linea di principio, la presenza di lesioni Gd+ e la comparsa di nuove lesioni in T2/FLAIR[267], siano chiaramente, ai fini clinici, i due parametri RM fondamentali per il neurologo clinico nel monitorare la risposta a qualunque terapia.

Tecniche avanzate di risonanza magnetica (Spettroscopia, Diffusione, Magnetization transfer Imaging, Diffusion Tensor Imaging, lesioni corticali)

Spettroscopia

La spettroscopia (*Magnetic resonance Spettroscopy*-MRS) consente una rilevazione non invasiva di alcuni cambiamenti biochimici delle lesioni rispetto alla NAWM. Nelle lesioni acute, anche in fase precoce, la MRS evidenzia l'aumento di colina (Cho), dei lattati (Lac), dei lipidi (LIP) e diminizione della creatina (Cr) (con aumento del rapporto Cho/Cr), del mioinositolo (Mi), di glutammato/glutammina (Glx). L'incremento di Cho e dei LIP deriva dall'aumento dei livelli di fosfolipidi di membrana (fosfolipidi e glicerolo/fosfocolina) e di mielina rilasciati durante la mielinolisi. L'aumento del Lac, marcatore di glicolisi anaerobia, deriva invece dai fenomeni ischemici secondari all'infiammazione. Nelle lesioni demielinizzanti acute di grandi dimensioni si può osservare anche una diminuizione della Cr, che è elemento del metabolismo energetico e riflette probabilmente la perdita assonale. Gli spettri a basso tempo di echo mostrano aumenti transitori del Mi, che è lievemente ridotto nelle placche acute e aumenta nelle lesioni croniche, poichè riflette l'aumentato contenuto gliale. Infine la diminuizione del Glx (marker astrocitario), patogeneticamente non chiaro, è segnalato in diverse condizioni infiammatorie del SNC. Le placche croniche della SM hanno caratteristiche diverse: in un periodo di qualche giorno/settimana dopo la fase acuta si verifica una progressiva normalizzazione dei Lac e della Cho; sono necessari mesi affinchè LIP e Mi tornino alla normalità. Le placche croniche presentano una diminuzione del picco del N-acetil aspartato (NAA), quale possibile marker della disfunzione/perdita assonale e neuronale, molto più evidente nei *black holes*. Il riscontro di NAA ridotto senza un corrispondente valore normale del picco di Cho è un elemento utile nella diagnosi differenziale con le neoplasie gliali (che presentano infatti anche un incremento del picco di Cho).

Diffusione (Diffusion Weighted Imaging)

La DWI è una sequenza RM basata sulla diffusività delle molecole d'acqua libere e consiste effettivamente in due tipi di immagini: la traccia di diffusione (o immagine DWI) e la mappa del coefficente di diffusione apparente (o immagine ADC). L'immagine DWI è un'immagine fortemente pesata in T2, in cui le aree con lunghi tempi di rilassamento T2 presentano iperintensità artefattuale (effetto trasparenza-T2*/T2-shine through*) che mima la diffusione ristretta. Solo la valutazione della mappa ADC, che non rileva l'effetto *shine through,* consente il corretto inquadramento delle iperintesità in DWI. Le lesioni con diffusione ristretta appaiono infatti iperintense nell'immagine DWI ed ipointense nella mappa ADC, al contrario quelle con diffusione aumentata sono iperintense anche in ADC. Sia l'edema citotossico, sia quello mielinico (accumulo di acqua libera o vacuolizzata negli *sheets* mielinici) mostrano diffusività ristretta. Al contrario l'edema vasogenico, causato da aumentata permeabilità della BEE e quello interstiziale, determinati dalla diffusione subependimale di acqua nell'idrocefalo acuto, presentano diffusione aumentata. Quindi, le lesioni acute della SM evidenziano più frequentemente diffusione ristretta (edema intramielinico) e più raramente aumentato (edema vasogenico, distruzione della mielina/perdita assonale) per ampliamento dello spazio extracellulare con conseguente aumento della diffusione dell'acqua rispetto alla NAWM. Le placche croniche non mostrano più diffusività alterata. Comunque l'ADC non è ritunuta in genere in grado di discriminare tra placche acute e croniche.

Magnetization Transfer Imaging

La RM convenzionale è basata sul segnale proveniente dai protoni dell'acqua libera (*free water-bulk*) mentre il segnale proveniente da quelli parte dell'acqua contenuta nelle macromolecole cellulari (proteine, lipidi di membrana ecc.-*hydratation*) non è normalmente captato in quanto questi presentano tempi di rilassamento estremamente brevi[172,268]. In effetti, convenzionalmente, quando si parla di "protoni" come base del segnale di RM ci si riferisce proprio ai protoni

dell'acqua libera. La tecnica MTI si riferisce al trasferimento di magnetitizzazione longitudinale (T1) dei protoni dell'acqua legata alla magnetizzazione longitudinale dei nuclei di idrogeno della quota libera. Essendo la quota libera priva di interazioni con altre molecole, i suoi protoni hanno una maggiore e più omogenea frequenza di rotazione. Grazie a questa uniformità, la maggior parte di questi protoni hanno frequenze di risonanza che si trovano solo di poco al di sotto della normale frequenza di risonanza del protone (63 MHz a 1.5T). L'alta frequenza di rotazione fa si inoltre che ci siano meno interazioni con i protoni vicini (spin-spin) cosicchè il tempo espressione della perdita della magnetizzazione trasversale (T2) è lungo (questa è la base dell'alta instensità di segnale dei fluidi nelle sequenze T2 pesate). Al contrario, i protoni dell'acqua legata sono rallentati dalla estesive interazioni con i protoni delle macromolecole e quindi lo spettro delle loro frequenze di risonanza è estremamente ampio. Questo fa si che la perdita della magnetizzazione trasversale sia estremamente rapida (con T2<200 mcs). Proprio per i valori T2 così piccoli, il contributo al segnale RM di questa quota è normalmente irrilevante. Ciò nonostante, se un impulso di saturazione (*off-resonance pulse*), caratterizzato dall'essere costituito da un ampio spettro di frequenze, viene applicato alla quota legata, mentre la quota di magnetizzazione trasversale (T2) creata decade rapidamente, la quota longitudinale (T1) viene trasferita alla quota libera, determinando un allungamento del suo T1 (in condizioni normali, nella SB, di circa 5 volte). Questo incremento del T1 dell'acqua libera, quindi, provoca una riduzione dell'intensità di segnale in quelle regioni dove il magnetization transfer (MT) è rilevante. Di conseguenza, nel caso della SM, le aree con alterato contenuto mielinico, proprio in virtù della riduzione del contenuto in macromolecole e quindi dell'acqua legata, avranno un minore Magnetization Trasfer Ratio (MTR) ed appariranno più intense rispetto al segnale delle aree sane nelle immagini post-saturazione. In conclusione quindi le aree demielinizzate appariranno iperintense rispetto al restante parenchima nelle sequenze post-saturazione (MTon/post-*off-resonance pulse*) rispetto alle immagini base (MToff/pre-*off-resonance pulse*) ed infine poi

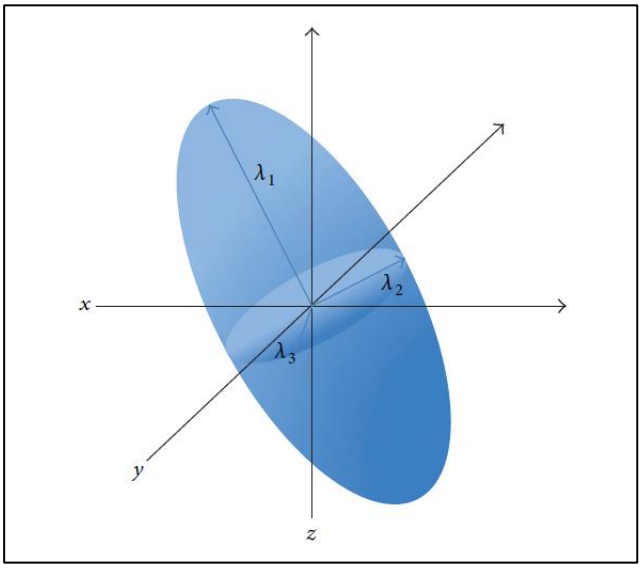
ipointense rispetto al parenchima sano nelle immagini post-processate derivate dalla conversione in metrica MTR. Pertanto le lesioni focali, sia recenti che non, mostrano un MTR ridotto che correla con la durata della captazione del Gd e con l'ipointensità T1[172]. In effetti, studi patologici hanno dimostrato come la riduzione del MTR correla con il grado di danno tissutale sottostante causato dall'infiltrazione linfocitaria, dall'attivazione microgliale, dal danno mielinico e dalla degenerazione assonale[269-271], anche se, sostanzialmente, il MTR è un marker di riduzione del contenuto in mielina. Il segnale MTR cambia chiaramente quindi tra le diverse lesioni demielinizzanti in base alla severità dell'insulto tissutale sottostante[172,269,270]. Quello che tuttavia risulta più interessante è stata l'applicazione della tecnica MTI alla NAWM ed alla NAGM. Diversi studi hanno infatti individuato, particolarmente nei pazienti *progressivi*[171,272,273], una riduzione del MTR proprio in quelle aree già patologicamente dimostrate essere interessate diffusamente da infiammazione, perdita assonale e gliosi ed ha permesso quindi di confermare la sensibilità di questa metodica nello studio del tessuto "apparentemente sano". Gli stessi autori hanno altresì dimostrato la correlazione tra i valori MTR della NAWM e della NAGM e la disabilità del paziente, evidenziando come il quadro clinico del paziente SM sia il risultato dell'interazione tra il carico lesionale "convezionale" e la patologia diffusa del tessuto apparentemente sano.

Diffusion Tensor Imaging

Questa tipologia di tecnica di RM misura il moto browniano delle molecole d'acqua nei tessuti, che è influenzato dalla presenza di diverse barriere come le membrane cellulari ed altre macromolecole[195,268]. L'acqua libera normalmente si muove egualmente in tutte le direzioni in maniera isotropica; quando, al contrario, il movimento è limitato all'interno delle cellule o dalla presenza di barriere tissutali, il movimento diventa anisotropico in quanto vengono assunte delle direzioni preferenziali. Quindi, il movimento delle molecole d'acqua è marcatamente ridotto nei tessuti compatti come nella SB, meno nella SG ed è

completamente libero nel LCS. I processi patologici, alterando la normale struttura cerebrale influenzano il movimento dell'acqua alterando i cosiddetti parametri di diffusione. Le immagini di diffusione possono essere ottenute da un minimo di tre direzioni di gradiente, dando vita a due differenti tipi di sequenze: le immagini pesate in diffusione (*diffusion-weighted imaging*-DWI) e quelle con tensore di diffusione (*diffusion tensor imaging*-DTI). Queste ultime sono ottenute da una matrice acquisita con almeno 6 direzioni di gradiente, caratterizzando il movimento dell'acqua in un ambiente tridimensionale. La matrice può essere rapresentata come un ellissoide con 3 assi principali (figura 7).

Figura 8. Rappresentazione ellittica di un tensore di diffusione con i 3 assi principali (Fonte: Sbardella E. et al., Multiple Sclerosis International 2013)[274]



L'asse più lungo λ1 è il primario e riflette la diffusione parallela alle fibre, la cosiddetta diffusione assiale (*axial diffusivity*-AD); al contrario, la media dei due assi più corti λ2 e λ3 fornisce una misura della diffusione perpendicolare alle fibre, la diffusione radiale appunto (*radial diffusivity*-RD). Le misure suddette sono in grado di discriminare il danno assonale e il danno mielinico, specificatamente il primo essendo maggiormente rappresentato dalla AD ed il secondo dalla RD[274] (tabella 7).

Tabella 7. Descrizione schematica dei principali parametri DTI (Fonte: Sbardella E. et al., Multiple Sclerosis International 2013)[274]

	Unit of measure	Formula	Object measured
FA	Scalar value ranging between 0-1	$\sqrt{\frac{1}{2}}\frac{\sqrt{(\lambda_1-\lambda_2)^2+(\lambda_2-\lambda_3)^2+(\lambda_3-\lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2+\lambda_2^2+\lambda_3^2}}$	Fibers directionality/axonal loss
MD	mm^2/sec	$(\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3)/3$	Amount of water diffusion/myelin loss
AD	mm^2/sec	λ_1	Diffusivity parallel to the fibers/myelin and axonal content
RD	mm^2/sec	$(\lambda_2+\lambda_3)/2$	Diffusivity perpendicular to the fibers/myelin content

FA: fractional anisotropy; MD: mean diffusivity; AD: axial diffusivity; RD: radial diffusivity; mm: millimeters; sec: second.

Nei tratti di SB in corso di SM, la RD è tipicamente aumentata indicando la perdita di mielina mentra la AD può essere diminuita o aumentata, indicando nel primo caso il danno assonale, e nel secondo la presenza di meccanismi di compenso ai fini del ripristino della funzionalità nei tratti di SB interessati dal danno. D'altronde però le misure DTI maggiormente utilizzate sono derivata da una combinazione matematica dei tre vettori assiali λ1, λ2 e λ3. Specificatamente la diffusione media (*mean diffusivity*-MD) rappresenta globalmente il movimento dell'acqua senza una particolare direzione, più alto è il valore di MD maggiore è il grado di diffusione delle molecole d'acqua; l'anisotropia frazionata (*fractional anisotropy*-FA), invece, rappresenta la diffusione prevalentemente lungo una direzione, il valore di FA varia da 0 a 1 ed è maggiore nei tratti compatti di SB, si riduce nella SG e approccia lo 0 nel LCS. Sia la MD che la FA sono correlate principalmente al contenuto di mielina e solo in piccola parte alla densità assonale. Ciononostante la MD è prevelentemente interpretata come un indice di spazio libero, ciò vuol dire che processi come l'edema vasogenico o la perdita mielinica e assonale ne provocano l'aumento[275,276]. D'altra parte la FA, invece, è più sensibile all'integrità strutturale della SB, purtroppo senza specificità patologica, non essendo in grado di distinguere tra edema, infiammazione, demielinizzazione o leucoaraiosi[171,195].

Nella SB le molecole d'acqua hanno un movimento preferenzialmente lungo la direzione degli assoni, ciò spiega gli elevati valori di FA e AD in queste regioni[195,276]. Numerosi studi hanno evidenziato un incremento della MD e RD associato alla riduzione della FA e AD nelle lesioni demielinizzanti della SB ed allo

stesso modo, anche se chiaramente in maniera meno significativa, nella NAWM[276,277]. Queste alterazioni dei parametri di diffusione variano con la severità, la durata ed il fenotipo di SM[175,278,279]. La variabilità spaziale nelle misure di MD, RD, FA e AD nelle placche, nonchè il loro modifcarsi nel tempo all'interno della stessa lesione, suggerisce una notevole eterogeneità dei meccanismi patologici sottostanti e della loro severità[195]. È anche stato dimostrato come alterazioni della diffusività siano evidenziabili già prima della formazione della placca[278]. In conclusione quindi, in corso di SM, l'aumento della MD e RD e la riduzione della AD e FA sinteticamente correlano rispettivamente con la demielinizzazione e con la perdita assonale[171,195,275,278,280]. Non sorprende quindi come la MD sia inversamente correlata con i valori di MTR[277], in quanto le due metodiche sottendono gli stessi meccanismi patologici. Esiste ad oggi anche la possibilità di generare delle mappe basate sulla FA rappresentative dei fasci di sostanza bianca, per poter valutare più dettagliatamente come il danno mielinico sia eterogeneo lungo un singolo fascio di assoni (*Diffusion Tensor Tractography*) e di correlarlo con un particolare tipo di deficit clinico. Ad esempio è stato dimostrato come il danno dei fasci di associazione intercorticali sia correlato con l'*impairment* cognitivo e come il danno lungo le vie corticospinali con la disabilità nella deambulazione[195,219].

Per ciò che concerne la sostanza grigia, sia corticale che delle strutture grigie profonde dell'encefalo quali il talamo ed il nucleo caudato, diversi autori hanno individuato in corso di SM una discrepanza tra l'alterazione dei valori di DTI rispetto alla SB, evidenziando accanto ad un franco incremento dei valori di MD, una scarsa alterazione dei valori di FA, suggerendo che la demielinizzazione prevale sul danno assonale. Nello specifico, sono descritti sia un aumento che una riduzione dei valori di FA. Questo risultato potrebbe essere spiegato dal tipo di patologia della SG al momento dell'analisi; nel caso di un'attivazione prevalente della microglia si osserverebbe un incremento dei valori di FA, al contrario, in caso di dominanza dei meccanismi di infiammazione si avrebbe una riduzione dei valori[274,281,282]. Inoltre è stato dimostrato come, chiaramente, le

lesioni corticali abbiano tendenzialmente parametri di diffusione più alterati (maggiore incremento di MD e FA) rispetto alla NAGM.

Infine, come già discusso per il MTI, anche in corso di DTI, la NAGM e la NAWM presentano valori patologici che correlano con le caratteristiche cliniche del paziente SM[281].

Lesioni corticali

L'utilizzo della sequenza FLAIR, specialmente ad alto campo, può rivelare non solo la presenza di lesioni iuxtacorticali ma anche di lesioni che sconfinano nella SG[283]. Le sequenze di RM convenzionale non sono tuttavia adeguate alla visualizzazione delle lesioni corticali, in quanto queste sono di dimensione molto ridotte, mostrano poco contrasto con il tessuto circostante e sono potenzialmente affette da artefatti da volume parziale[171]. Le lesioni corticali sono molto frequenti nell'ambito delle forme progressive di malattia ma possono essere anche presenti nelle forme più precoci recidivanti-remittenti[284,285]. La loro presenza è associata con un maggiore rischio di epilessia sintomatica e di compromissione cognitiva[286-288]. Inoltre, come già accennato, nei pazienti progressivi le lesioni corticali insieme all'atrofia cerebrale correlano meglio rispetto al carico lesionale della SB con i parametri clinici di disabilità ed all'*impairment* cognitivo[219,289-291]. Ad oggi, la sequenza più usata per l'individuazione delle lesioni corticali è la *double inversion recovery* (DIR), sequenza basata sulla soppressione simultanea del segnale proveniente dal liquor dei ventricoli e degli spazi subaracnoidei e del segnale del grasso della mielina della SB. In tal modo si ottiene un immagine isolata della sostanza grigia[219,290,291]. Questa tecnica è dotata di alta specificità, ma non è in grado tuttavia di evidenziare tutte le lesioni intracorticali visibili all'esame istopatologico[219].

Capitolo 3 - La discriminazione temporale somatosensoriale: STD e STDT

La discriminazione temporale degli stimoli sensoriali (*somaesthetic temporal discrimination*-STD) viene definita come la capacità di percepire come separati nel tempo due stimoli sensoriali successivi applicati sulla stessa parte del corpo o in parti differenti[292]. Si tratta di un processo puramente sensoriale che consente al cervello di filtrare le informazioni provenienti dall'esterno, selezionando quelle rilevanti[293,294]. Uno tra i meccanismi su cui si basa questa funzione discriminativa è il *gating* degli stimoli sensoriali[295,296], processo che agisce come un filtro in caso di stimoli ripetuti e potenziali interferenze.

Nell'uomo, un metodo sperimentale che consente di valutare l'integrità dei processi di STD è lo studio della soglia di discriminazione temporale somatosensoriale (*Somatosensory Temporal Discrimination Threshold*-STDT). Lo studio di questa soglia si basa sull'erogazione di una coppia di stimoli sulla superficie volare delle dita della mano, inizialmente con un intervallo interstimolo (ISI) di 0ms e incrementando l'intervallo di 10 ms ogni volta. Il primo dei tre ISI consecutivi al quale il soggetto riconosce gli stimoli come separati nel tempo corrisponde alla STDT. Nella maggior parte degli individui sani, la percezione di due stimoli tattili distinti nel tempo avviene ad un ISI di 30-70 ms in funzione dell'età e del sesso dell'individuo.

Basi anatomiche della STDT

Lo studio di soggetti sani e con lesioni cerebrali focali[292] ha consentito di asserire che sarebbero diverse le aree corticali e sottocorticali coinvolte nella STD. Pastor e colleghi[297] hano dimostrato, per mezzo della risonanza magnetica funzionale (fMRI), un'attivazione selettiva dell'area motoria pre-supplementare (pre-SMA) indotta dall'analisi della STDT. Altri studi hanno individuato un coinvolgimento della corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC) destra che sarebbe coinvolta non solo nella memoria di lavoro, ma anche nel *temporal processing* cognitivamente controllato (per lunghi intervalli)[298-300]. Suddetta area riceverebbe input dai gangli della base e dal cervelletto[301], che sarebbero quindi

parte attiva dei circuiti sottocorticali coinvolti nella STD[302-305]. Una funzione preminente viene attribuita allo striato[306,307] e alla sostanza nera pars compacta (SNc)[308]: a questo proposito, soggetti affetti da malattia di Parkinson presentano una discriminazione temporale alterata, che migliora in seguito a terapia dopaminergica[309,310].

Il possibile ruolo nella determinazione della STDT di molte delle strutture sopra citate è stato indagato in uno studio di Conte e collaboratori[311]. In esso, la STDT è stata misurata prima e dopo l'applicazione di una *theta burst stimulation* continua (cTBS) ed intermittente (iTBS) sull' area somatosensoriale primaria (S1) destra, sulla pre-SMA, sulla DLPFC destra e sull'emisfero cerebellare sinistro. È stato evidenziato che la cTBS (che ha un effetto inibitorio sull'eccitabilità corticale), induce un aumento della STDT quando applicata su S1, ma non sulle altre aree corticali, il cui ruolo nella determinazione di questa soglia verrebbe quindi ridimensionato. La iTBS (che ha un effetto eccitatorio) induceva, al contrario, una riduzione dei valori della soglia. Questi dati sono in contrasto, quindi, con il ruolo preminente nella determinazione della STDT attribuito alla pre-SMA dal lavoro di Pastor[297]. D'altronde, sempre nello studio di Conte[311], il riscontro di un aumentato numero di errori commessi dai soggetti dopo la cTBS erogata sulla pre-SMA, potrebbe essere riconducile ad una funzione più integrativa che quest'ultima eserciterebbe tra strutture corticali e sottocorticali. D'altra parte, la DLPFC potrebbe essere non essenziale nel processamento temporale che coinvolge ISI brevi e potrebbe intervenire solo in decodifiche temporali soggette al controllo delle funzioni cognitive superiori. Rocchi e collaboratori[312] hanno approfondito il ruolo di S1 nella codifica della STDT sempre mediante l'applicazione di tecniche cTBS, correlate in questo caso anche allo studio dei potenziali evocati somatosensoriali (SEP) e delle oscillazioni ad alta frequenza (HFO). L'applicazione di cTBS su S1 ha indotto un aumento dei valori della STDT associato ad una ridotta inibizione del ciclo di recupero di N20 e a una riduzione dell'ampiezza dell'area delle HFO. Tutti e tre gli effetti erano correlati. Questo ha consentito non soltanto di confermare il ruolo di S1 nella

determinazione di STDT, ma soprattutto di ipotizzare come la cTBS riduca l'efficacia delle interazioni a carattere inibitorio che normalmente permettono di affinare il processamento temporale degli stimoli sensoriali. Questo porta a concludere come probabilmente la STDT dipenda da meccanismi a carattere inibitorio all'interno di S1.

STDT e movimento

La corretta elaborazione temporale ed il gating degli stimoli sensoriali costituiscono un prerequisito essenziale per l'esecuzione di movimenti precisi ed accurati. Gli input sensoriali, sia tattili che propriocettivi, sono continuamente monitorati così da consentire una correzione del piano motorio e del movimento stesso. Questo processo, noto come integrazione sensorimotoria, è basato su un processamento temporale degli stimoli sensitivi[313-315]. Al contempo, il movimento stesso a sua volta è in grado di influenzare l'accesso dello stimolo sensoriale e la sua integrazione centrale. Come il movimento modifichi la percezione degli stimoli sensoriali è appunto oggetto di studio ormai da tempo[316,317]. Diversi autori hanno dimostrato come prima dell'inizio e durante il movimento la sensibilità tattile si riduca (attenuazione sensoriale)[318-320]. L'esecuzione di un movimento inoltre sarebbe in grado di alterare la localizzazione e la durata dello stimolo tattile nel dominio spaziale[321], così che durante il movimento volontario gli stimoli tattili sarebbero delocalizzati nella direzione del movimento[321-323].

Un recente studio nel soggetto sano ha indagato i meccanismi attraverso i quali il movimento volontario modula la discriminazione temporale dello stimolo tattile[324]. La STDT è stata testata durante l'abduzione volontaria (fasica e tonica) e passiva del dito indice, nonchè durante l'immaginazione del movimento e prima e dopo la stimolazione magnetica transcranica ripetitiva su S1 (cTBS). La STDT è stata valutata sulla mano che eseguiva il movimento, dapprima in assenza di contrazione (valore basale) e successivamente a 0ms (stimoli concomitanti con l'inizio del movimento), 100 ms, 200 ms, 500 ms e 5 s dall'inizio della

contrazione. L'intervallo tra il movimento e la stimolazione STDT è stato selezionato in maniera randomizzata per evitare che affaticamento ed apprendimento potessero indurre in errori di interpretazione dei risultati. Durante il movimento volontario fasico veloce, i valori della soglia sono risultati aumentati quando lo stimolo era applicato da 0 ms fino a 200 ms, mentre ritornavano al basale a 500 ms e 5 sec. Con le stesse modalità, l'incremento della STDT si è osservato anche durante il movimento fasico lento e passivo, sebbene in maniera meno marcata rispetto al movimento fasico veloce; al contrario, i valori non si sono modificati durante la contrazione tonica. Del resto un'alterazione dei parametri di STDT rispetto al basale non si è osservata se questa veniva valutata in distretti corporei non coinvolti nel movimento, né durante la preparazione allo stesso o l'immaginazione del piano motorio. Lo studio della STDT, inoltre, non determinava alcuna variazione del picco della velocità, della durata e della cinematica del movimento durante il task di integrazione sensorimotoria. La stimolazione transcranica su S1 ha indotto un aumento dei valori della STDT rispetto al basale, pur lasciando invariata la variazione percentuale della STDT indotta dal movimento fasico. Per cui, è possibile affermare che la STDT (e quindi l'integrazione somatosensoriale) sia codificata a livello di S1, come già ipotizzato dagli stessi autori[311,312], sebbene il processo di integrazione sensorimotoria ed il *gating* dell'informazione sensoriale non sembrerebbero avvenire a livello corticale; è da escudere infatti anche un possibile ruolo di modulazione di S1 da parte di M1 (mediante connessione cortico-corticale), in quanto l'immaginazione e la preparazione al movimento non hanno generato un incremento dei valori di STDT. Gli autori ipotizzano pertanto che sia un sistema di integrazione sottocorticale a svolgere il ruolo di selezione dell'informazione sensoriale, tutelando maggiormente l'informazione propriocettiva durante l'esecuzione del movimento a discapito di quella tattile (incremento dei valori di STDT). Un possibile ruolo di inibizione sensoriale da parte delle vie discendenti motorie a livello spinale è stato studiato ed escluso, in quanto la contrazione tonica non ha indotto modifiche della STDT ed inoltre i

valori di STDT registrati oltre i 200 ms dall'inizio del movimento erano paragonabili a quelli basali. Viene infine quindi ipotizzato che le strutture principalmente coinvolte nell'integrazione sensorimotoria sottocorticale siano il talamo e lo striato. Nello specifico il primo riceve afferenze dal cervelletto (programmazione del movimento) e dal midollo spinale (esecuzione del movimento) risultando una prima stazione di STD, che si completerebbe, come detto, in S1. Il secondo (particolarmente il putamen), non solo, come noto, regola direttamente il movimento, ma, ricevedo afferenze dalla corteccia premotoria e motoria primaria e proiettando efferenze sul talamo stesso, sarebbe in grado di modulare l'attività di *gating* di quest'ultimo favorendo appunto l'input propriocettivo a quello tattile. Appare quindi fondamentale il ruolo decisionale dello striato nel regolare l'integrazione talamica e indirettamente l'afferenza somatosensoriale in S1 da parte di quest'ultimo (inducendo appunto l'alterazione dei valori di STDT). È stato ipotizzato, in conclusione, che la modulazione della STDT durante l'esecuzione motoria sia mediata quindi dalle connessioni anatomiche e funzionali tra i gangli della base ed il talamo. A conferma di questa ipotesi uno studio molto recente[325] ha analizzato le variazioni di STDT durante il movimento in soggetti affetti da malattia di Parkinson ed ha osservato che il processo di *gating* sensoriale in questi pazienti sia alterato (ridotto gating della STDT durante il movimento) e determini contestualmente una riduzione delle performance motorie (peggioramento delle caratteristiche cinematiche del movimento durante l'applicazione di procedura STDT). L'osservazione che in questi pazienti la terapia dopaminergica normalizzava la modulazione della STDT durante il movimento avvalora ulteriormente l'ipotesi che i gangli della base svolgano un ruolo primario nella integrazione sensorimotoria.

STDT e Sclerosi Multipla

In un recente studio di Rocchi e colleghi[326], la STDT è stata analizzata in soggetti affetti da SM caratterizzati da un basso livello di disabilità funzionale e da una

normale conduzione lungo le vie somatosensoriali centrali indagata con i SEP. I valori di STDT nei soggetti con SM studiati sono risultati maggiori rispetto a quelli riscontrati nei soggetti sani, al contrario la latenza di N20 ai SEP non era dissimile fra i due gruppi. Non è stata, inoltre, riscontrata alcuna correlazione con il grado di disabilità, quest'ultimo dato probabilmente da correlare al ristretto range di EDSS nel campione esaminato. Gli aumentati valori basali della STDT nei soggetti con SM rispetto ai controlli sani potrebbe essere spiegato semplicemente considerando l'alterata trasmissione degli impulsi ad alta frequenza indotta dal danno della sostanza bianca lungo la via di conduzione tattile (a livello spinale o cerebrale). La demielinizzazione assonale potrebbe, infatti, compromettere la conduzione dei due stimoli tattili, separati da poche decine di millisecondi, su cui la STDT si basa. D'altra parte, lo stesso danno alla sostanza bianca potrebbe non compromettere la conduzione degli impulsi alle basse frequenze di stimolazione tipicamente utilizzate per lo studio dei PES. In alternativa, è stato ipotizzato che l'alterata STD sia da imputare ad una compromissione dell'attività di S1 dovuta al danno della sostanza grigia, sempre più frequentemente documentata nella SM, verosimilmente non rilevabile con le tecniche convenzionali di RM. Il processo degenerativo che coinvolge la sostanza grigia corticale e sottocorticale nel corso della malattia è, infatti, considerato la principale causa dei sintomi cognitivi che si riscontrano in questi soggetti. Diversi studi[327-329] hanno, infatti, dimostrato una correlazione tra le alterazioni della sostanza grigia rilevate mediante risonanza magnetica con una ridotta performance cognitiva e, tra le diverse strutture sottocorticali, il talamo è stato definito come un "barometro"[327,330] del diffuso danno neuropatologico nella SM. L'alterazione di questa soglia sarebbe, quindi, legata ad una dispersione del segnale lungo le vie sensitive (non rilevabile ai SEP), ad una compromissione della sostanza grigia o, piuttosto, ad entrambe?

Obiettivi

Visto quanto analizzato fin'ora in merito al ruolo fondamentale del talamo e dei gangli della base nell'integrazione sensorimotoria[324] e alla luce del possibile coinvolgimento di queste strutture da parte dei processi infiammatori e degenerativi peculiari della SM[327-329], il presente studio si pone come obiettivo quello di valutare come stimoli sensoriali e movimento vengano integrati in questa tipologia di pazienti. Pur essendo nota la relazione tra danno della sostanza grigia e ridotte performance cognitive nella SM, ad oggi, non esiste un *marker* surrogato di facile esecuzione ed elevata riprocibilità in grado di indicare precocemente un impegno patologico delle strutture sottocorticali. Infatti, come esaminato, ad oggi, l'unica metodica è il calcolo dei volumi mediante analisi di RM, che richiede un oneroso impegno di tempo, risorse ed adeguata preparazione strumentale e tecnica, difatti il calcolo dell'atrofia non è eseguito di routine nel controllo radiologico seriato del paziente affetto da SM.

Con il presente lavoro, è stata indagata la soglia di discriminazione temporale degli stimoli sensoriali (STDT) e la sua modulazione durante l'esecuzione di un compito motorio e le caratteristiche cinematiche del movimento stesso. I dati acquisiti sono stati posti a confronto con i sani e successivamente i risultati neurofisiologici sono stati correlati con la disabilità (valutata mediante EDSS) e con le misure di volumetria e diffusione cerebrale acquisite mediante lo studio di risonanza magnetica. In questo caso, in particolare, si è voluto valutare se un'eventuale alterazione dei dati neurofisiologici fosse da imputare principalmente ad un danno della sostanza bianca lungo le via di conduzione, attraverso l'analisi del carico lesionale, o della sostanza grigia, mediante il calcolo dei volumi sottocorticali, dei parametri di diffusione.

Materiali e metodi

Popolazione in esame

In questo studio trasversale abbiamo incluso un gruppo di 38 soggetti affetti da SM recidivante-remittente e un gruppo di 27 soggetti sani reclutati presso il dipartimento di Neurologia e Psichiatria dell'università "Sapienza" di Roma. I due gruppi erano confrontabili in termini di età e sesso. Lo studio è stato approvato dal comitato etico e tutte le procedure sperimentali sono state eseguite in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Previa firma del consenso informato tutti i partecipanti sono stati sottoposti a valutazione neurologica, neuropsicologica, neurofisiologica e ad esame di RM encefalo.

I criteri di inclusione erano:

-maschio o femmina di età compresa tra i 18 e i 50 anni;

-in grado di firmare il consenso informato;

-diagnosi di SM in accordo ai criteri revionati di Polman del 2010[111];

-forma recidivante-remittente di malattia;

-EDSS al momento dell'arruolamento compreso tra 0 e 3.5;

I criteri di esclusione erano:

-controindicazione alla RM per presenza di aneurismi intracranici, storia di frammenti intraorbitari, presenza di *pace-maker* o valvole cardiache non compatibili, impianti acustici non rimovibili, storia di claustrofobia;

-se femmina, positività al test di gravidanza su campione di urine;

-storia di patologia renale (controindicazione al mezzo di contrasto);

-incapacità a fornire il consenso informato;

-deterioramento cognitivo (potenzialmente in grado di alterare la valutazione della STDT).

Parametri clinici e valutazione neuropsicologica

Tutti i soggetti affetti da SM sono stati sottoposti a visita neurologica con valutazione del punteggio EDSS e delle tre componenti della scala clinica MSFC (9-HPT, FTW e PASAT-3). La valutazione neuropsicologica è stata effettuata mediante la *Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests* (BRB-NT)[331] e lo *Stroop test*. La BRB-NT si compone di: *Selective Reminding Test* per la valutazione della memoria verbale e della rievocazione; *10/36 Spatial Recall Test* per la memoria visuospaziale e la rievocazione; *Symbol Digit Modalities Test* e *Paced Auditory Serial Addition Test* per l'attenzione e concentrazione; *World List Generation Test* per il richiamo semantico; lo Stroop test è utilizzato per la valutazione dell'attenzione selettiva. Inoltre sono state somministrate anche la *Fatigue Severity Scale* (FSS) per la valutazione della fatica la *State-Trait Axiety Inventory* (STAI) 1 e 2 per l'ansia e la *Beck Depression Inventory* (BDI) per la depressione. Come già specificato il riscontro di un profilo alla valutazione neuropsicologica indicativo di un deterioramento cognitivo era criterio di esclusione per l'arruolamento.

Protocollo neurofisiologico

Tutti i soggetti arruolati sono stati sottoposti a valutazione della STDT basale, della STDT durante il movimento, delle caratteristiche cinematiche del movimento stesso prima e durante la stimolazione STDT e a registrazione dei PES e PEM.

Procedura per la misurazione della STDT

Durante lo studio, i soggetti sedevano rilassati su una sedia dotata di braccioli accanto al tavolo di lavoro. La procedura prevedeva l'erogazione di coppie di stimoli tattili con un intervallo interstimolo (ISI) inizialmente di 0 ms (coppia di stimoli simultanea) e in seguito la somministrazione di stimoli con intervallo ISI progressivamente crescente con un incremento di 10 ms ad ogni stimolazione.

Questo modello rappresenta una procedura sperimentale validata in precedenti studi per la determinazione della STDT[312]. Le coppie di stimoli tattili consistevano in impulsi elettrici ad onda quadra somministrati tramite un generatore di corrente (DIGITIMER DS7AH) applicati sulla cute con elettrodi di superficie in cui l'anodo era distanziato 0.5 cm dal catodo. L'applicazione di questi elettrodi avveniva, nel corso della sperimentazione, sulla superficie volare del dito indice della mano dominante. La soglia di discriminazione temporale (STDT) corrispondeva al primo ISI di tre consecutivi al quale cui il soggetto era in grado di discriminare gli stimoli come separati tra di loro e quindi di percepirne due in maniera chiara e distinta.

L'intensità della stimolazione per ogni singolo soggetto è stata decisa anticipatamente somministrando stimoli ad intensità crescente partendo da 2 mA con incrementi di 0.5 mA per volta. L'intensità di stimolazione è stata definita come quella minima alla quale il soggetto percepiva una serie completa di 10 stimolazioni consecutive.

Allo scopo di mantenere la concentrazione del soggetto durante il test e per evitare che i risultati fossero inficiati da risposte perseverative sono stati inclusi dei cosiddetti *catch trials*, consistenti nella somministrazione di uno stimolo singolo in maniera randomizzata per verificare che il soggetto lo riferisse correttamente come singolo.

Tecniche di registrazione

Registrazione elettromiografica

L'attività elettromiografica è stata registrata tramite l'utilizzo di elettrodi di superficie (Ag, AgCl) posizionati al di sopra del muscolo primo interosseo. La configurazione del posizionamento degli elettrodi prevedeva il collocamento dell'elettrodo negativo sul ventre muscolare e di quello positivo sul tendine del muscolo indagato. Le tracce elettromiografiche sono state registrate e filtrate tramite un Digitimer D360 (Digitemer Ltd, UK) con una frequenza da 20 Hz a 1

kHz; sono state poi analizzate offline mediante un personal computer dotato di uno specifico software per la misurazione: 1401 plus A/D laboratory interface (Cambridge Electronic Design, UK). I dati sono stati, inoltre, depositati su un computer di laboratorio per poterli visualizzare on-line sul display e in seguito per procedere con le misurazioni off-line (Signal software; Cambridge Electronic Design, UK).

Registrazione del movimento e task motorio

Per la registrazione delle caratteristiche cinematiche del movimento del dito indice della mano dominante è stato utilizzato un sistema SMART (BTS Engineering, Milan, Italy) fornito di tre telecamere a raggi infrarossi con frequenza di campionamento a 120 Hz.

Il task motorio consisteva in un movimento fasico, veloce e unidirezionale di abduzione del dito indice della mano dovuto all'attivazione del muscolo primo interosseo dorsale. Per garantire la corretta esecuzione del movimento, il braccio veniva bloccato durante tutto l'esperimento e le escursioni articolari erano controllate visivamente. È stato anche costantemente controllato che la posizione della sedia rispetto al tavolo rimanesse stabile e così anche la posizione dell'avambraccio sul tavolo. Il braccio veniva mantenuto abdotto rispetto alla spalla di 45-50° e l'articolazione del gomito era flessa a circa 90°[332].

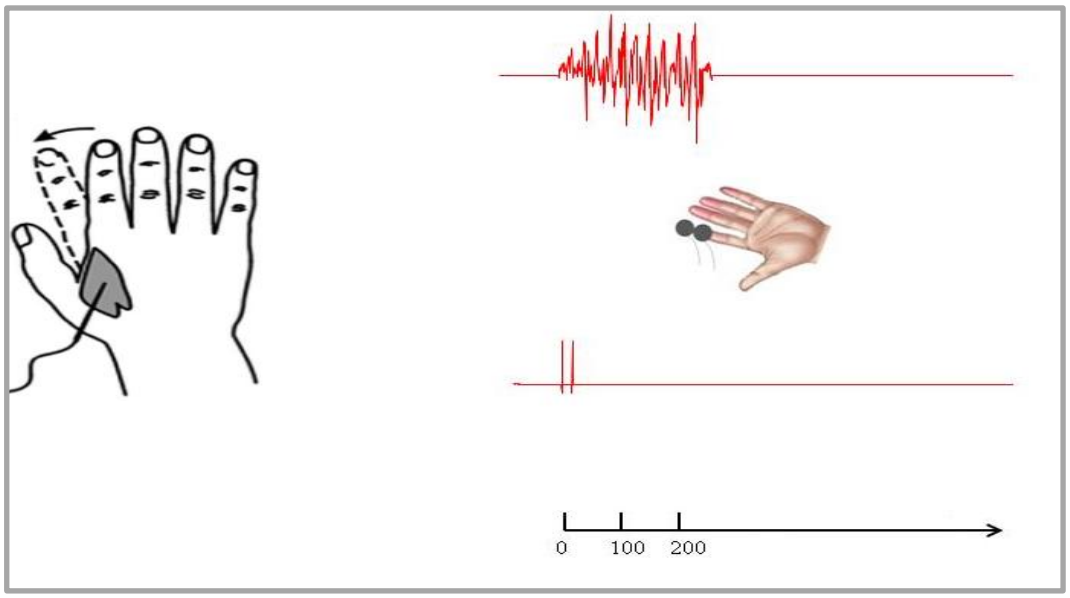
Per la registrazione cinematica sono stati posizionati dei marker riflettenti, e il movimento di questi veniva rilevato dalle tre telecamere ad infrarossi posizionate di fronte al soggetto in direzioni differenti in modo da poter analizzare globalmente il movimento nei diversi piani spaziali. I marker sono stati posti sulla falange distale del primo dito, sulla base del I metacarpo, sulla testa del II metacarpo e sulla base del V metacarpo della mano dominante, in modo da poter registrare la massima escursione del movimento di abduzione del dito stesso. Il movimento veniva iniziato dopo un segnale verbale di "via" fornito dallo sperimentatore; in seguito il soggetto cessava il movimento riportando il dito in posizione iniziale. Il movimento doveva essere il più possibile ampio,

accurato e rapido e i soggetti venivano incoraggiati dagli sperimentatori ad eseguirlo correttamente durante tutta la seduta sperimentale. Lo spostamento dei marker durante il compito motorio è stato ricostruito e analizzato mediante un software dedicato dotato di algoritmi per l'analisi dei valori della velocità, della distanza angolare e della durata.

Paradigma sperimentale

Nel protocollo sperimentale ai soggetti sono state somministrate coppie di impulsi elettrici per la determinazione della STDT, dapprima basale in assenza di movimento, e successivamente durante il task motorio. Specificatamente, in questo caso, dopo valutazione delle caratteristiche cinematiche basali, la stimolazione tattile era innescata dall'inizio del movimento stesso, rilevato mediante tecniche di registrazione EMG. Il movimento consisteva nell'abduzione del dito indice e gli stimoli venivano erogati ad intervalli di tempo differenti rispetto all'inizio del movimento ed applicati sulla superficie volare dell'ultima falange del dito indice della mano che eseguiva il compito motorio (Figura 9).

Figura 9. Paradigma sperimentale.



Nello specifico, analogamente a quanto effettuato in studi precedenti, per definire le caratteristiche della modulazione della STDT rispetto all'inizio del movimento, la coppia di stimoli è stata erogata ad intervalli di tempo diversi a partire dall'inizio dello stesso (0 ms, 100ms e 200ms). La STDT è stata determinata per ciascuno di questi intervalli.

Ad esempio, nel trial definito "0ms", la coppia di stimoli elettrici veniva somministrata 0ms dall'inizio del movimento, e pertanto ad esso contemporanea. La soglia di attività elettromiografica che dava il via alla somministrazione degli stimoli elettrici corrispondeva a 100 μV di attività. All'interno del trial "0ms" l'ISI della coppia di stimoli veniva incrementato in passi di 10ms ad ogni movimento completo di abduzione dell'indice, fin quando il soggetto non riconosceva i due stimoli come sequenziali tra loro. La determinazione della STDT è stata ripetuta tre volte per ogni trial e ogni volta il valore considerato è stato il primo dei tre ISI consecutivi riconosciuti dal soggetto come sufficienti per percepire due stimoli separati tra loro. Il valore soglia corrispondeva quindi alla media delle tre rilevazioni effettuate per ogni trial. Come per il trial "0ms", anche per gli altri trial definiti "100ms" e "200ms", la coppia di stimoli veniva somministrata rispettivamente dopo 100ms e 200ms dall'inizio del movimento.

Tutti i trial inclusi nell'esperimento sono stati eseguiti in maniera randomizzata così da evitare un meccanismo di apprendimento del task, eccetto la determinazione basale della STDT, ossia senza movimento, che è stata sempre eseguita al principio.

Potenziali Evocati Somatosensoriali (PES)

Per valutare la conduzione degli impulsi nervosi lungo le vie somatosensoriali fino in corteccia (area somatosensoriale primaria, S1), al fine di escludere un deficit della conduzione alla base di un'eventuale alterazione della discriminazione temporale degli stimoli somatosensoriali, ciascun soggetto è stato sottoposto all'esame dei PES. In questo caso la stimolazione elettrica è

stata eseguita al polso in corrispondenza del nervo mediano della mano dominante mediante uno stimolatore a corrente (Digitimer DS7A). Gli impulsi elettrici ad onde quadre monofasiche della durata di 200 μs sono stati erogati al 250% della soglia sensitiva e alla frequenza di 5 Hz. Gli elettrodi registranti sono stati posti: a livello sovraclaveare (punto di Erb), per registrare il propagarsi dello stimolo lungo le strutture del plesso brachiale (N9); sulla regione parietale post-rolandica controlaterale, per registrare l'arrivo dell'impulso in corteccia sensitiva, ossia N20. L'elettrodo referente è stato posizionato sullo sterno per N9 e su Fpz per N20.

Potenziali Evocati Motori (PEM)

Lo studio funzionale delle vie corticospinali è stato eseguito mediante i PEM. È stato utilizzato uno stimolatore magnetico monofasico Magstim (Magstim Company Ltd) che eroga, attraverso una bobina posta sullo scalpo, stimoli magnetici che inducono una corrente elettrica nel parenchima cerebrale e attivano per via transinaptica i neuroni della corteccia motoria primaria (M1). Le risposte muscolari a breve latenza sono state registrate mediante elettrodi di superficie dalla mano dominante (controlaterale a quella dell'emisfero stimolato). La latenza del PEM veniva calcolata come l'intervallo tra l'artefatto di stimolo e l'inizio del potenziale evocato motorio nel muscolo I interosseo a riposo.

Protocollo neuroradiologico

Protocollo di imaging

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad una sessione di RM multimodale con scanner 3-Tesla (Magnetic Verio, Siemens, Erlangen, Germania) con bobina a 12 canali progettata per l'imaging in parallelo (*generalized autocalibrating partially parallel acquisition,* GRAPPA). Prima dell'acquisizione delle immagini, i

partecipanti sono stati istruiti a sdraiarsi, svegli, con gli occhi chiusi, e a rilassarsi completamente.

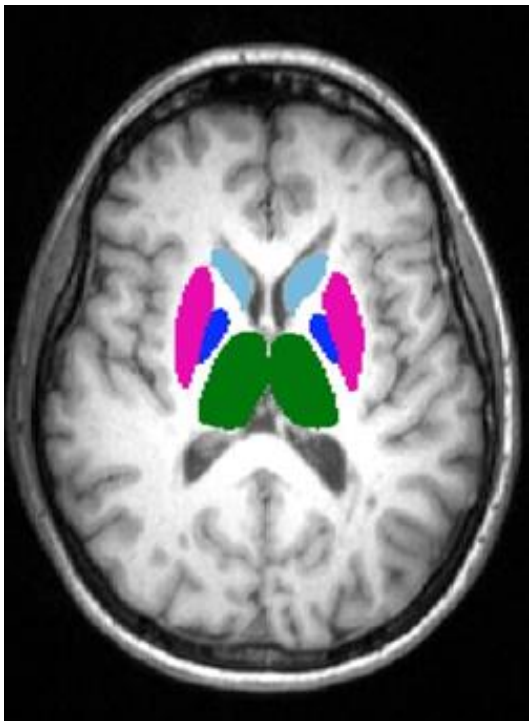
Lo studio di RM ha incluso:

1) sequenza T1-3D MPRAGE (*magnatization prepared rapid gradient-echo*): TR=1900 ms, TE=2.93 ms, 176 sezioni sagittali di 1 mm di spessore, senza intervallo, flip angle=9°, FOV=260 mm, matrice=256x256, tempo di acquisizione=3 minuti e 48 secondi;
2) Sequenza T2-DP (*dual turbo spin-echo*): TR=5790 ms, TE1=10 ms, TE2=103 ms, 45 sezioni sagittali di 3 mm di spessore, senza intervallo, flip angle=150°, FOV=220 mm, matrice=384x90, tempo di acquisizione=5 minuti e 42 secondi;
3) Sequenza DTI (*diffusion tensor imaging*): TR=12200 ms, TE=94 ms, 92 sezioni sagittali di 2 mm di spessore, senza intervallo, direzioni=30, FOV=192 mm, matrice=96x100, tempo di acquisizione=6 minuti e 56 secondi.

Analisi di risonanza

Il calcolo del volume lesionale globale (*lesion volume*-LV) è stato eseguito su immagini pesate in T2-DP, utilizzando una tecnica semi-automatica in Jim (versione 5.0, Xinapse System, Leicester, UK, http://www.xinapse.com). Per il calcolo dei volumi sottocorticali (putamen, nucleo caudato, nucleo pallido e talamo) le immagini 3D-T1 sono state processate con FIRST, tool di FSL (versione 5.0.7, University of Oxford, Oxford, UK, http://www.fmrib.ox.ac.uk/fslwiki) (Figura 10). Infine mediante le sequenze DTI, sono stati calcolati i valori di MD (*Mean Diffusivity*) e FA (*Fractional Anisotropy*) all'interno delle strutture sottocorticali suddette.

Figura 10. Maschera delle strutture sottocorticali ottenuta con software FIRST (FMRIB Library) sovrapposta ad immagine pesata in T1. Strutture sottocorticali: azzurro: nucleo caudato; blu: globo pallido; rosa: putamen; verde: talamo.



Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate usando SPSS (version 23, IBM, New York, USA, https://www.ibm.com/it-it/marketplace/spss-statistics). La distribuzione normale delle variabili è stata verificata con l'analisi visiva degli istogramma di distribuzione e con il test di Kolmogorov-Smirnov. L'omogeneità dei due gruppi per caratteristiche demografiche è stata verificata mediante test χ^2 per il sesso e test t di Student per dati indipendenti per l'età. I dati neurofisiologici sono stati analizzati mediante ANOVA tra gruppi, per confrontare i parametri cinematici del movimento e i valori di STDT basali tra i pazienti con SM e i soggetti di controllo. Abbiamo quindi confrontato le percentuali di variazione dei parametri STDT e cinematici del movimento durante il task di integrazione sensorimotoria mediante ANOVA per misure ripetute con fattore GRUPPO (2 livelli: SM vs. normali) e fattore ISI (4 livelli corrispondenti agli

intervalli intercorrenti tra l'inizio del movimento e le coppie di stimoli per la determinazione della STDT: basale, 0 ms, 100 ms e 200 ms). Il confronto dei parametri di RM è stato effettuato mediante test t di Student. Abbiamo infine correlato i dati clinici, neurofisiologici e di RM calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson (r). Il metodo delle correlazioni parziali è stato utilizzato per la correlazione tra la variazione percentuale della velocità del movimento e la MD delle strutture sottocorticali (EDSS, STDT basale e velocità basale come variabili di controllo). I valori di $p<0.05$ sono stati considerati come statisticamente significativi.

Risultati

Caratteristiche cliniche e demografiche

Sul totale dei 38 pazienti affetti da SM 31 sono femmine (81.58%) e 7 sono maschi (18.42%). L'età media al momento dell'arruolamento era di 40.08 anni (DS 7.18) e la durata di malattia media era di 9.57 anni (DS 8.16). La mediana del punteggio EDSS era 1.5 (range 0-3.5). Il gruppo di controllo era costituito da 27 soggetti sani paragonabili per età e sesso. Le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti dello studio sono descritte in tabella 8.

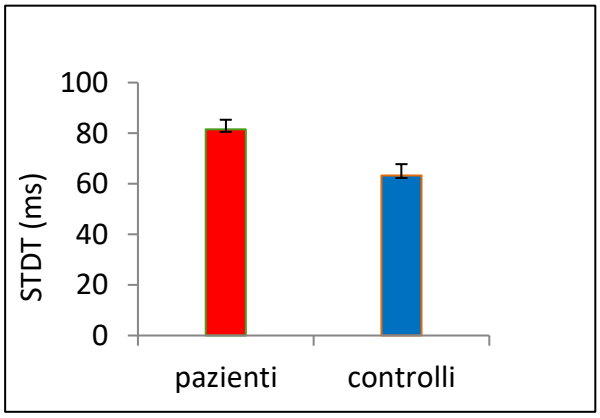
Tabella 8. Caratteristiche cliniche della popolazione. Valori espressi come media e (DS), se non indicato diversamente.

Caratteristiche cliniche	Soggetti RRMS, n=38	Soggetti controllo, n=27
Sesso, F/M (%)	31/7 (81.58/18.42)	22/5 (81.48/18.52)
Età, anni	40.08 (7.18)	40.52 (6.87)
Durata di malattia, anni	9.57 (8.16)	-
EDSS, mediana (range)	1.5 (0-3.5)	-

Confronto dei parametri neurofisiologici tra gruppi

I valori della STDT basale sono risultati significativamente più alti nei pazienti affetti da SM (81.5 ± 23ms) rispetto ai controlli (63 ± 22ms) [ANOVA ad una via significativa per fattore GRUPPO, F=9.67, p=0.002] (figura 11).

Figura 11. Confronto della STDT basale tra pazienti affetti da SM e soggetti sani di controllo.

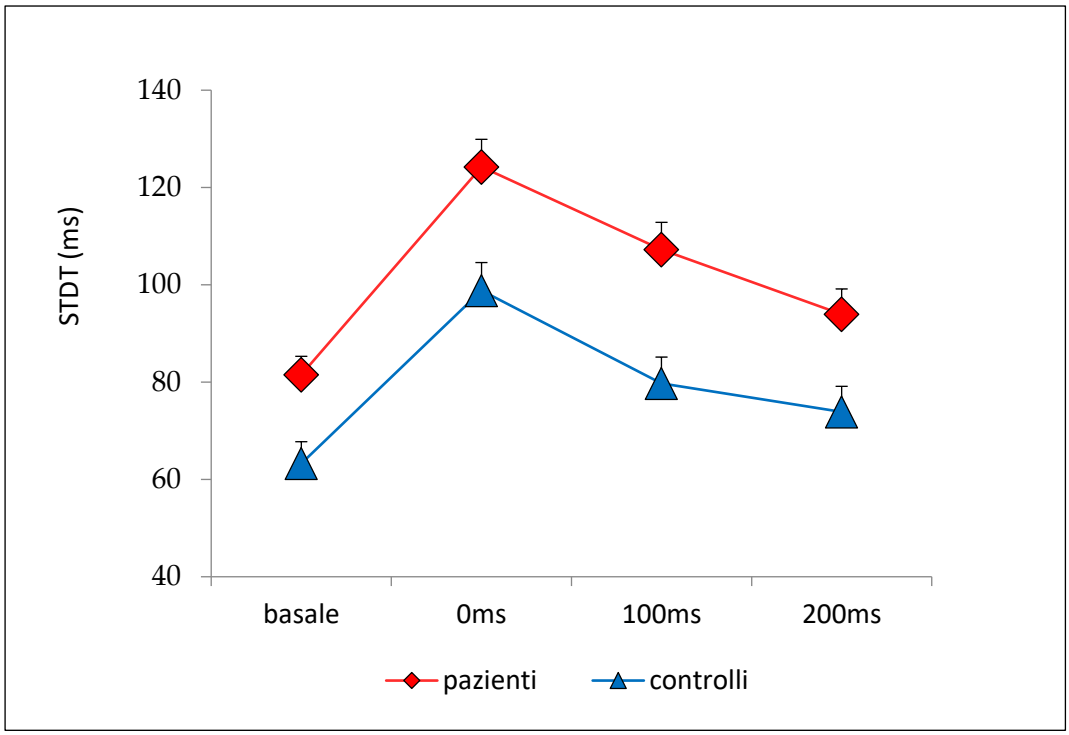


La velocità del movimento al basale è risultata significativamente più bassa nei pazienti (75 ± 33 gradi/sec) rispetto ai controlli (97.4 ± 39 gradi/sec) [ANOVA ad una via significativa per fattore GRUPPO, F=4.18, p=0.04].

L'esame dei PES e dei PEM è risultato normale nel 76% dei pazienti affetti da SM (29 su 38).

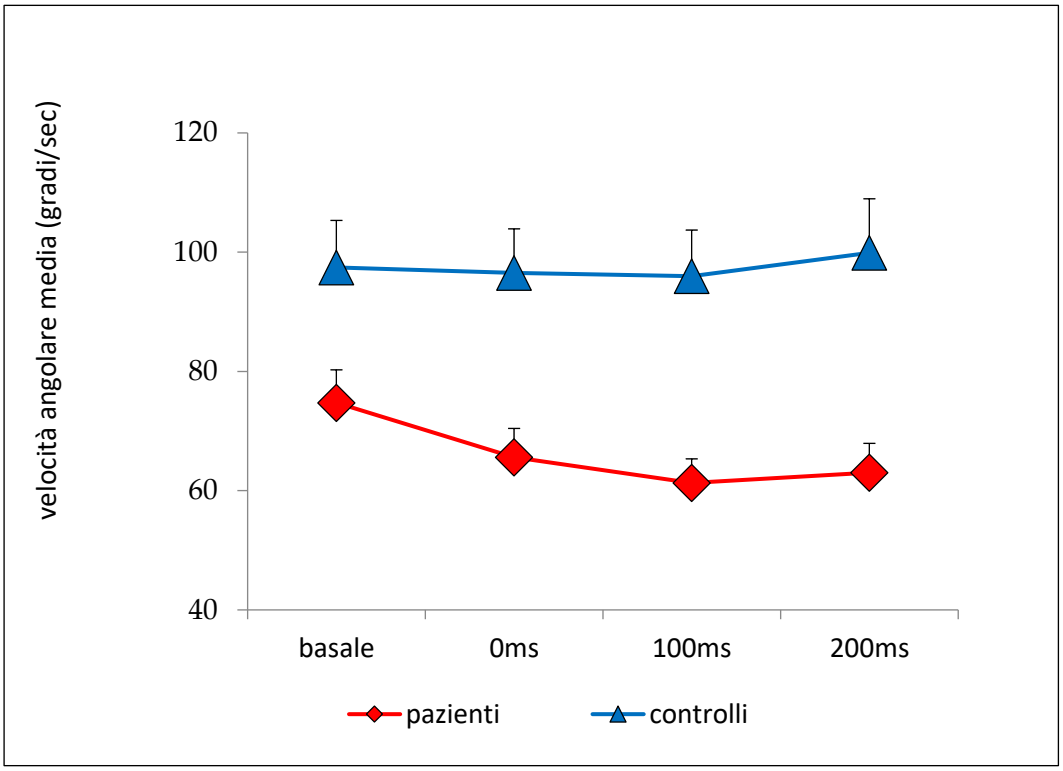
L'ANOVA per misure ripetute per l'analisi delle variazioni percentuali della STDT durante il movimento ha evidenziato una significatività del fattore ISI (F=50.39; p<0.05) ma non del fattore gruppo (F=0.27; p=0.59) o dell'interazione (F=0.55; p=0.60). Pertanto le variazioni percentuali della STDT durante il movimento in relazione all'intervallo intercorrente tra inizio della contrazione e stimolazione tattile risultavano analogamente significative in tutti i casi, indipendentemente dal gruppo di appartenenza (Figura 12).

Figura 12. Modificazioni della STDT indotte dal movimento nei pazienti con SM e nei soggetti sani di controllo. Si noti come le variazioni della STDT durante il movimento siano equiparabili nei due gruppi. L' ANOVA ha evidenziato una significatività del fattore ISI (F=50.39; p<0.05), ma non per il fattore GRUPPO (F=0.27; p =0.59) o dell'interazione GRUPPO×ISI (F=0.55; p=0.6).



L'analisi di confronto delle variazioni percentuali della velocità media del movimento ha evidenziato una significatività del fattore ISI (F=2.99; p=0.03), del fattore GRUPPO (F=8.99; p=0.004) oltre ad una significativa interazione ISIxGRUPPO (F=2.83; p=0.04). Durante il compito di integrazione sensorimotoria la velocità media del movimento si riduceva in maniera significativa quindi solo nei soggetti con SM (p=0.003) ma non nei soggetti sani (Figura 13).

Figura 13. Modificazioni della velocità del movimento durante il task di integrazione sensorimotoria. Si noti come, rispetto ai soggetti sani di controllo, la velocità angolare media si riduceva in maniera significativa nei soggetti con SM, quando la STDT viene analizzata durante il movimento. ANOVA: Fattore ISI=2.99, p=0.03; Fattore Gruppo=8.99, p=0.004; Interazione GruppoxISI=2.83, p=0.04.



Confronto dei parametri di RM tra gruppi

Rispetto al gruppo di controllo l'analisi volumetrica delle strutture sottocorticali ha evidenziato un volume significativamente ridotto del solo nucleo caudato (p=0.02). I pazienti presentavano un carico lesionale pari a 5458.6 ± 4180.6 mm^3 (tabella 9).

Tabella 9. Confronto dei parametri volumetrici tra pazienti e sani. Valori espressi come media e (DS).

Parametro RM, volume	Pazienti SM, n=38	Controlli sani, n=27	P-value
LV, mm^3	5458.6 (4180.6)	-	-
Nucleo caudato, mm^3	4300 (347)	4571 (508)	0.02
Putamen, mm^3	6283 (533)	6248 (871)	NS
Pallido, mm^3	2134 (146)	2179 (310)	NS
Talamo, mm^3	9731 (780)	10086 (842)	NS

Il confronto dei parametri di DTI ha evidenziato una differenza significativa rispetto ai controlli della MD all'interno del putamen (p=0.02), pallido (p=0.04) e talamo (p=0.04) e della FA nel pallido (p=0.02) (tabella 10).

Tabella 10. Confronto dei parametri di diffusione tra pazienti e sani. Valori espressi come media e (DS).

Parametro RM, diffusione		Pazienti SM, n=38	Controlli sani, n=27	P-value
Mean Diffusivity	Caudato	0.00099 (0.08)	0.00096 ($1*10^{-5}$)	0.7
	Putamen	0.00083 (0.06)	0.00071 ($2*10^{-5)}$	0.02
	Pallido	0.00078 (0.06)	0.00066 ($4*10^{-5}$)	0.04
	Talamo	0.00096 (0.09)	0.00086 ($4*10^{-5}$)	0.04
Fractional Anisotropy	Caudato	0.22 (0.06)	0.25 (0.04)	0.11
	Putamen	0.28 (0.06)	0.30 (0.03)	0.13
	Pallido	0.37 (0.09)	0.43 (0.03)	0.02
	Talamo	0.33 (0.07)	0.36 (0.03)	0.16

Correlazioni tra dati clinici, neurofisiologici e di RM nei pazienti affetti da SM

Nei pazienti i valori di STDT basale correlano linearmente con l'EDSS (r=0.39, p=0.02) e con il volume del talamo (r=-0.38, p=0.02) (figura 14 e 15). La volumetria talamica correla inoltre negativamente con l'EDSS (r=-0.44, p=0.008).

Figura 14. Correlazione tra STDT basale ed EDSS. Si noti come vi sia una correlazione significativa tra i valori in maniera direttamente proporzionale (r= 0.39, p=0.02).

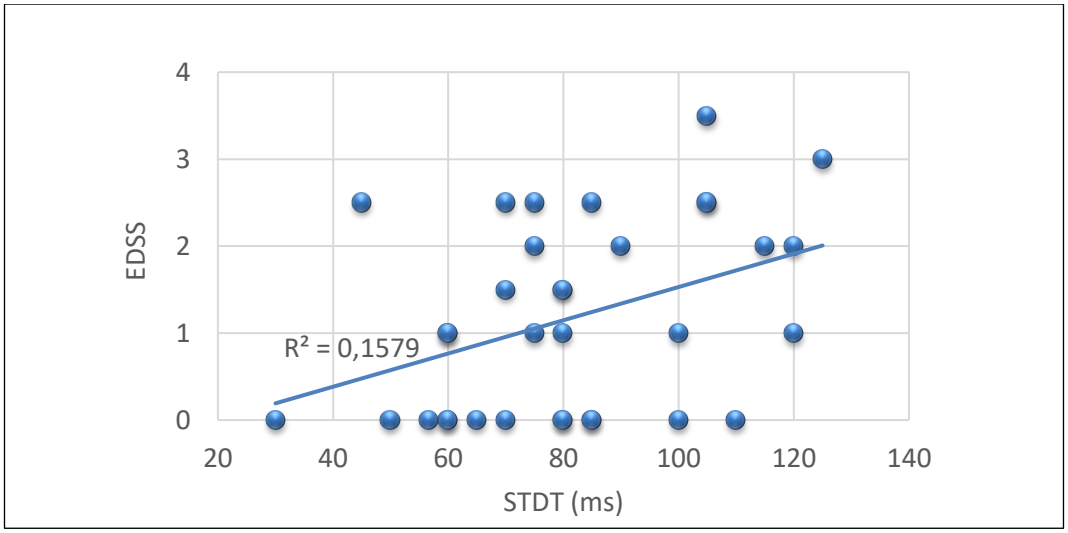
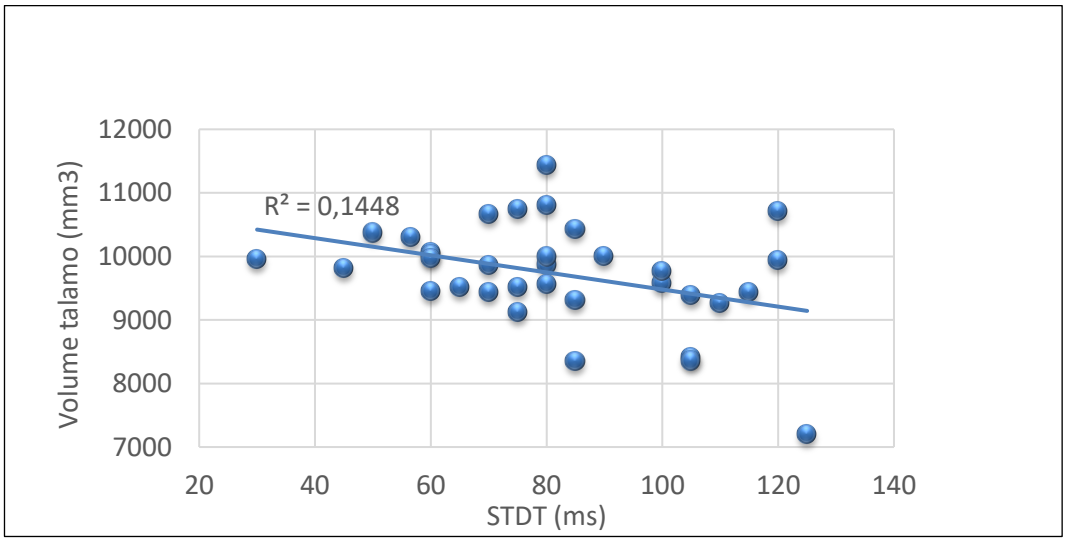
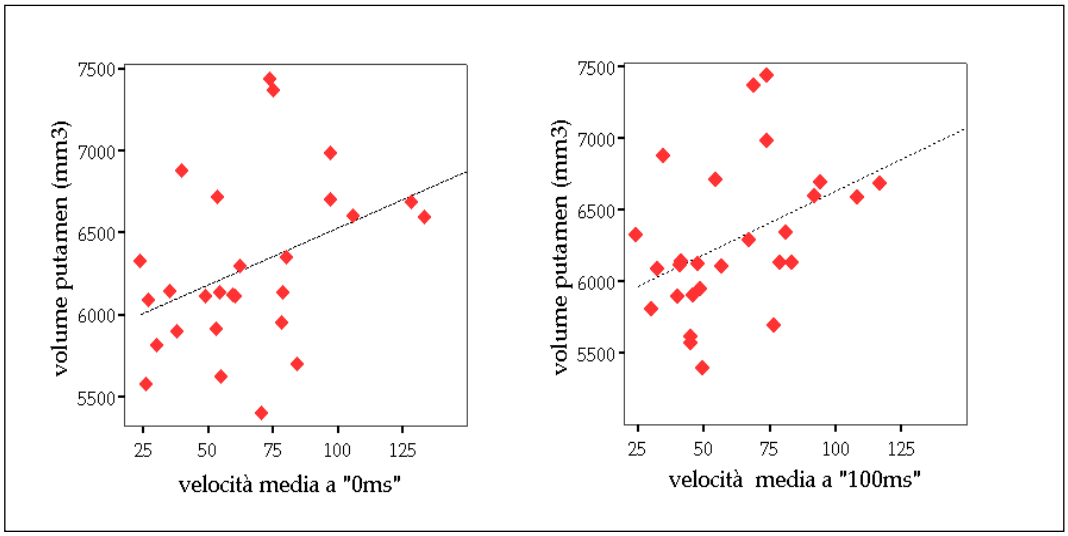


Figura 15. Correlazione tra STDT basale e volume talamico. Si noti come vi sia una correlazione significativa tra i valori in maniera inversamente proporzionale (r=-0.38, p=0.02).



Durante la stimolazione STDT, i valori di variazione percentuale della velocità media del movimento relativa ai trials “0 ms” e “100 ms” correlano positivamente con i valori di volumetria del putamen (0 ms: r=0.39, p=0.03; 100 ms: r=0.42, p=0.02) (figura 16).

Figura 16. Correlazione tra variazioni percentuali della velocità media relativi ai trials “0ms” e “100ms” e i valori volumetrici del putamen (0 ms: r=0.39, p=0.03; 100 ms: r=0.42, p=0.02).



Per quanto riguarda i parametri di diffusione, è stata determinata una correlazione negativa statisticamente significativa tra la variazione percentuale rispetto al basale della velocità media al trial “0 ms” e la MD del putamen (r=-0.40, p=0.04), la MD del pallido (r=-0.42, p=0.02) e la MD del talamo (r=-0.46, p=0.01). Tali correlazioni sono mantenute applicando come parametri di controllo l’EDSS, la STDT basale e la velocità del movimento basale (rispettivamente r=-0.41, p=0.04; r=-0.46, p=0.02; r=-0.47, p=0.02).

Infine, nessuna correlazione è stata individuata tra le misure neurofisiologiche ed il carico lesionale (LV) della sostanza bianca.

Discussione

In questo studio abbiamo indagato le caratteristiche della discriminazione somatosensoriale e dell'integrazione sensorimotoria confrontando un gruppo di pazienti affetti da SM recidivante-remittente e un gruppo di controlli sani paragonabili per caratteristiche demografiche. Successivamente, nei pazienti, abbiamo correlato i dati neurofisiologici alla disabilità e ai parametri volumetrici e di diffusione delle strutture sottocorticali.

Nei soggetti affetti da SM, i valori basali della STDT sono risultati più elevati rispetto ai controlli sani e correlati significativamente in maniera diretta con la volumetria del talamo e in maniera inversa con i valori di disabilità valutati mediante EDSS. Inoltre il volume del talamo è risultato correlato negativamente con la disabilità, nonostante non sia stata identificata una sua differenza significativa rispetto ai controlli. Questi dati confermano, come già discusso precedentemente, come il processo di integrazione somatosensoriale sia in parte espletato a livello talamico, e come, probabilmente, anche nei soggetti affetti da un basso indice di disabilità, esista un precoce coinvolgimento microstrutturale del talamo in grado di alterarne la funzione. Non è sorprendente, quindi, come l'alterazione patologica del talamo influenzi negativamente anche l'*impariment* clinico globale del paziente affetto da SM. L'interessamento diffuso talamico è dimostrato dall'alterazione dei valori di MD ma non della FA rispetto ai controlli sani. Questo dato è in accordo con diversi studi che hanno già dimostrato il coinvolgimento precoce della sostanza grigia corticale e sottocorticale in corso di SM, individuando appunto accanto ad un franco incremento dei valori di MD, una scarsa alterazione dei valori di FA, suggerendo che la demielinizzazione prevalga sul danno assonale[274,281,282]. Resta da chiarire però quanto, in parte, l'alterazione della STDT sia imputabile anche al coinvolgimento patologico diretto della corteccia somatosensoriale primaria. Se è vero che il ruolo del talamo è di integrare parzialmente le afferenze sensoriali proiettando poi in corteccia, come noto, è quest'ultima il principale determinante della STDT[324]. E' infatti in corso

l'analisi dello spessore corticale di S1, che ci permetterà di approndire questa tematica. Il riscontro nel nostro studio di un aumento dei valori basali di STDT nei soggetti affetti da SM rispetto ai controlli ha confermato i dati noti in letteratura[326]. Tra le ipotesi avanzate per spiegare gli aumentati livelli di STDT dei pazienti rispetto ai controlli, nello studio di Rocchi et al., si faceva riferimento ad un possibile ruolo del danno alla sostanza bianca; tuttavia, la mancanza di correlazione tra il carico lesionale e i valori basali alterati di STDT (nonché con alcun parametro neurofisiologico), ci permette di confermare come appunto il processo di integrazione somatosensoriale non sia alterato a causa di un deficit di conduzione lungo i fasci di sostanza bianca encefalica. Inoltre, il riscontro di PES normali nella maggior parte dei soggetti permette di ipotizzare, nonostante la bassa sensibilità di questa metodica neurofisiologica, che l'alterazione basale della STDT non dipenda neanche da un deficit dei trasmissione dell'input sensitivo. Chiaramente questa ipotesi andrebbe confermata mediante il calcolo del carico lesionale spinale.

Considerato quindi che il talamo è stato spesso definito come un possibile biomarcatore di neurodegenerazione nella SM[327,328,330], la correlazione evidenziata dal presente studio tra il suo volume e gli aumentati valori basali della STDT consente di immaginare un impiego di quest'ultima metodica come precoce indicatore surrogato di danno diffuso delle strutture sottocorticali senza necesssariamente dover ricorrere alle analisi volumetriche.

Nel nostro studio, inoltre, si è evidenziata una riduzione significativa del volume del nucleo caudato nei pazienti rispetto ai controlli. Questo nucleo, insieme al putamen, con cui costituisce funzionalmente il corpo striato, rappresenta un crocevia di informazioni verso il talamo e la corteccia. Alla luce del ruolo svolto dal corpo striato anche nel processamento temporale degli stimoli sensoriali[307] e delle sue interconnessioni con il talamo, il ridotto volume del nucleo caudato riscontrato nei pazienti con SM studiati potrebbe costituire un correlato

anatomico della disfunzione del circuito nucleobasale di integrazione sensorimotoria.

L'analisi del profilo di integrazione sensorimotoria mediante la valutazione del movimento durante la stimolazione STDT, ha evidenziato da un lato che la variazione percentuale della STDT rispetto al basale fosse sempre significativa ai diversi intervalli esaminati in maniera equiparabile tra i due gruppi, e dall'altro, tuttavia solo nei soggetti affetti da SM, una significativa riduzione della velocità angolare media. Quest'ultimo parametro è risultato significativamente correlato con le dimensioni del putamen, nonostante non sia stata individuata una sua differenza volumetrica rispetto ai controlli. Ancora, l'analisi dei dati di DTI ha evidenziato, però, una significativa alterazione del parametro di MD e non di FA all'interno del ganglio stesso. Questi dati appaiono compatibili con la dimostrazione non solo di un precoce coinvolgimento microstruttrale diffuso anche del putamen ma soprattutto di come sia fondamentale il suo ruolo nei processi di integrazione sensorimotoria, guidando il *gating* delle informazioni somatosensoriali durante il movimento. Nel gruppo di pazienti a bassa disabilità da noi esaminato evidentemente però il processo di integrazione è solo parzialmente alterato, ciò è dimostrato da come i valori di STDT vengano modulati con le stesse modalità dei controlli, nonostante appunto si sia osservata la riduzione della velocità media durante la stimolazione tattile.

Il processo di integrazione sensorimotoria appare coinvolgere d'altronde anche altre strutture sottocorticali. Infatti la demielinizzazione non è stata solo riscontrata nel talamo e nel putamen ma anche nel pallido, i cui valori di MD e FA sono stati individuati come significativamente alterati rispetto ai controlli. Inoltre è stata dimostrata una correlazione lineare negativa tra la variazione percentuale della velocità media al trial "0 ms" e la MD non solo del putamen, ma anche del pallido e del talamo. Tali correlazioni appaiono significative anche tenendo in considerazione il grado di disabilità del paziente, il valore di STDT basale e la velocità del movimento basale. Questi dati dimostrano genuinamente come

diverse strutture grigie sottocorticali siano coinvolte nel continuo processo di selezione delle informazioni sensoriali da processare ai fini del controllo del movimento. Infine, anche in questo caso, poiché l'esame funzionale delle vie sensitive e motorie, attraverso i PES e i MEP rispettivamente, è risultato nella norma nel 75% dei soggetti esaminati, si può ipotizzare che l'alterata integrazione tra input sensoriali e output motorio, quando la STDT veniva testata durante il movimento, non fosse imputabile ad un danno delle vie di conduzione.

Dunque, in conclusione, è possibile affermare che, tra i gangli della base, il putamen tramite le sue connessioni con il talamo, svolga un ruolo primario nel processamento temporale degli stimoli sensoriali, il quale rappresenta un prerequisito fondamentale dell'integrazione sensorimotoria.

I dati del nostro studio dimostrano quindi come nei pazienti affetti da SM, vi sia una difficoltà nell'integrazione di due diverse funzioni nell'ambito di un *dual-task*. Altri autori hanno indagato e dimostrato come, probabilmente in virtù di una ridotta riserva funzionale cerebrale legata all'accumulo precoce di danno infiammatorio e neurodegenativo, anche altre tipologie di integrazione funzionale possono risultare alterate in corso di SM[333-335]. Prosperini et al.[335], ad esempio, hanno evidenziato il fenomeno di interferenza cognitivo-motoria (*Cognitive-Motor Impairment*-CMI) che consiste in una riduzione delle capacità del soggetto nella deambulazione e nel mantenimento dell'equilibrio durante l'esecuzione di un test cognitivo.

Mettendo in evidenza una riduzione della velocità angolare media quando la STDT veniva studiata durante il movimento, il nostro lavoro conferma la presenza di un deficit di integrazione di diversi input a livello del SNC[335] e il ruolo fondamentale che i gangli della base hanno nell'integrazione degli input sensoriali al fine di una corretta programmazione ed esecuzione del movimento. Inoltre, poiché la correlazione tra dimensioni del putamen e velocità angolare media è stata evidenziata nei soggetti studiati indipendentemente dalla gravità della malattia, e quindi anche con EDSS score basso, in maniera analoga a quanto già discusso per il talamo, si può ipotizzare un impiego dello studio della STDT

durante il movimento come un biomarcatore di alterazione funzionale del putamen, anche nelle forme meno gravi della malattia.

Nel nostro studio sono state adottate diverse precauzioni per minimizzare la probabilità di *bias*. Il movimento di abduzione del dito indice è stato costantemente controllato dagli operatori che incoraggiavano i soggetti studiati e i controlli sani ad eseguire un movimento più ampio e veloce possibile durante tutta la procedura. Sono stati eseguiti, inoltre, dei *catch trials* con lo scopo di monitorare il livello di attenzione dei soggetti esaminati e una possibile perseverazione nelle risposte fornite agli operatori. Per evitare che variazioni della attenzione avessero un impatto sui risultati i trial "0 ms", "100 ms" e "200 ms" sono stati eseguiti in maniera randomizzata.

In conclusione i dati del nostro studio dimostrano come i processi di integrazione somatosensoriale e sensorimotoria siano alterati in corso di SM e come la valutazione della STDT basale e in dual-task con il movimento siano in grado di rilevare una precoce alterazione funzionale delle strutture sottocorticali, anche in assenza di una franca alterazione volumetrica alla RM.

Bibliografia

1. Fazio C, Loeb C. Neurologia. Società Editrice Universo, 1997.

2. Rudick R and Goodkin D. Multiple sclerosis therapeutics. Martin Dunitz, 2000.

3. Ebers GC, Daumer M. Natural history of MS. Eur J Neurol. 2008 Sep;15(9):881-2.

4. Kurtzke JF. Epidemiology of multiple sclerosis. Handbook of clinical neurology, revised series. Elsevier, 1985.

5. Canal N, Ghezzi A, Zaffaroni M et al. Sclerosi Multipla attualità e prospettive. Masson, 2001.

6. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. McGraw-Hill, 1997.

7. Pugliatti M, Cossu P, Sotgiu S, et al. Clustering of multiple sclerosis, age of onset and gender in Sardinia. J Neurol Sci. 2009 Nov 15; 286(1-2):6-13.

8. Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. Curr Opin Neurol. 2007 Jun; 20(3):269-74.

9. Sawcer S, Ban M, Maranian M, et al; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. Am J Hum Genet. 2005 Sep; 77(3):454-67.

10. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. N Engl J Med 1986; 315:1638-1642.

11. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twin: update. Ann Neurol 1993; 33:281-285.

12. IMSGC, WTCC2, Sawcer S, et al. Genetic risk and primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 2011 Aug 10; 476(7359):214-9.

13. Walsh EC, Guschwan-McMahon S, Daly MJ et al. Genetic analysis of multiple sclerosis. J Autoimmun. 2003 Sep;21(2):111-6.

14. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. J Neurol. 2007 Apr; 254(4):471-7.

15. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. Ann Neurol. 2007 Jun; 61(6):504-13.

16. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. Clin Micr Rev. 1993; 6:382-427.

17. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. Ann Neurol. 2007 Apr; 61(4):288-99.

18. Jilek S, Schluep M, Meylan P, et al. Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. Brain. 2008 Jul; 131(Pt 7):1712-21.

19. Maldonado-López R, De Smedt T, Pajak B, et al. Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. J Leukoc Biol. 1999 Aug; 66(2):242-6.

20. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. Nat Med. 2005 Mar; 11(3):335-9.

21. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. Nat Med. 2005 Mar; 11(3):328-34.

22. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17cells in relapsing EAE. Nat Immunol. 2007 Feb; 8(2):172-80.

23. Deshpande P, King IL, Segal BM. Cutting edge: CNS CD11c+ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25+CD4+ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. J Immunol. 2007 Jun 1; 178(11):6695-9.

24. Karni A, Abraham M, Monsonego A, et al. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. J Immunol. 2006 Sep 15; 177(6):4196-202.

25. Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, et al. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. J Neurochem. 2005 Oct ;95(2):331-40.

26. Kort JJ, Kawamura K, Fugger L, et al. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. J Neuroimmunol. 2006 Apr; 173(1-2):23-34.

27. Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. Am J Pathol. 1990 Oct; 137(4):789-800.

28. Tan L, Gordon KB, Mueller JP, et al. Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes. J Immunol. 1998 May 1; 160(9):4271-9.

29. Cornet A, Bettelli E, Oukka M, et al.vRole of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. J Neuroimmunol. 2000 Jul 1; 106(1-2):69-77.

30. Girvin AM, Gordon KB, Welsh CJ, et al. Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells. Blood 2002 May 15; 99(10):3692-701.

31. Pozner RG, Berría MI, Negrotto S, et al. Differential astrocyte response to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. Intervirology. 2005; 48(5):279-84.

32. Jack CS, Arbour N, Manusow J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. J Immunol. 2005 Oct 1; 175(7):4320-30.

33. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. Glia. 2005 Feb; 49(3):360-74.

34. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroinflammation. 2009 Apr 28; 6:14.

35. Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. Immunity 2010 Mar 26; 32(3):414-25.

36. Bebo BF Jr, Yong T, Orr EL, et al. Hypothesis: a possible role for mast cells and their inflammatory mediators in the pathogenesis of autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res. 1996 Aug 15; 45(4):340-8.

37. Ibrahim MZ, Reder AT, Lawand R, et al. The mast cells of the multiple sclerosis brain. J Neuroimmunol 1996 Nov; 70(2):131-8.

38. Sayed BA, Christy AL, Walker ME, et al. Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? J Immunol 2010 Jun 15; 184(12):6891-900.

39. Segal BM. The role of natural killer cells in curbing neuroinflammation. J Neuroimmunol 2007 Nov; 191(1-2):2-7.

40. Hao J, Liu R, Piao W, et al. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. J Exp Med 2010 Aug 30; 207(9):1907-21.

41. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1998 Jun 15; 86(2):123-33.

42. Pagenstecher A, Lassmann S, Carson MJ, et al. Astrocyte-targeted expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 2000 May 1; 164(9):4481-92.

43. Shi FD, Takeda K, Akira S, et al. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. J Immunol 2000 Sep 15; 165(6):3099-104.

44. Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, et al. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. Eur J Immunol 2001 Jun; 31(6):1656-65.

45. Gold R, Giovannoni G, Selmaj K, Havrdova E, et al.; SELECT study investigators. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2013 Jun 22; 381(9884):2167-75.

46. Bielekova B, Richert N, Herman ML, et al. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. Neurology. 2011 Nov 22; 77(21):1877-86.

47. Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. Curr Biol 2005 Jun 7; 15(11):R429-31.

48. Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS. Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 1; 88(15):6452-6.

49. Freedman MS, D'Souza S, Antel JP. gamma delta T-cell-human glial cell interactions. I. In vitro induction of gammadelta T-cell expansion by human glial cells. J Neuroimmunol 1997 Apr; 74(1-2):135-42.

50. Freedman MS, Bitar R, Antel JP. gamma delta T-cell-human glial cell interactions. Relationship between heat shock protein expression and susceptibility to cytolysis. J Neuroimmunol. 1997 Apr; 74(1-2):143-8.

51. Rinaldi L, Gallo P, Calabrese M, et al. Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: distinctive patterns characterize MRI-active patients. Brain 2006 Aug; 129(Pt 8):1993-2007.

52. Chen Z, Freedman MS. Correlation of specialized CD16(+) gammadelta T cells with disease course and severity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2008 Feb; 194(1-2):147-5.

53. Kobayashi Y, Kawai K, Ito K, et al. Aggravation of murine experimental allergic encephalomyelitis by administration of T-cell receptor gammadelta-specific antibody. J Neuroimmunol. 1997 Mar; 73(1-2):169-74.

54. Blink SE, Caldis MW, Goings GE, et al. γδ T cell subsets play opposing roles in regulating experimental autoimmune encephalomyelitis. Cell Immunol. 2014 Jul; 290(1):39-51.

55. Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, et al. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. Mol Cell Neurosci 2005 Jul; 29(3):381-93.

56. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. Mol Cell Neurosci. 2006 Jan; 31(1):149-60.

57. Aloisi F. Immune function of microglia. Glia 2001 Nov; 36(2):165-79.

58. Nguyen VT, Benveniste EN. Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. J Biol Chem 2002 Apr 19; 277(16):13796-803.

59. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. Nature 2007 Jul 26; 448(7152):474-9.

60. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. J Exp Med 2007 Oct 1; 204(10):2363-72.

61. Bartos A, Fialová L, Soukupová J, et al. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. Acta Neurol Scand. 2007 Aug; 116(2):100-7.

62. Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferonbetas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2007; 259(1-2):27- 37.

63. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al.IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med 2005 Jan 17; 201(2):233-40.

64. Lee KH, Hashimoto SA, Hooge JP, et al. Magnetic resonance imaging of the head in the diagnosis of multiple sclerosis: a prospective 2-year follow-up with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. Neurology 1991 May; 41(5):657-60.

65. Prineas JW, Wright RG.Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. Lab Invest 1978 Apr; 38(4):409-21.

66. Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, et al. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. Brain 1994 Dec; 117 (Pt 6):1311-22.

67. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. Brain Pathol 2004 Apr; 14(2):164-74.

68. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. Brain 2007 Apr; 130(Pt 4):1089-104.

69. Bar-Or A, Calabresi PA, Arnold D, et al. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. Ann Neurol. 2008 Mar; 63(3):395-400.

70. Naismith RT, Piccio L, Lyons JA, et al. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. Neurology 2010 Jun 8; 74(23):1860-7.

71. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al.; HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. N Engl J Med 2008 Feb 14; 358(7):676-88.

72. Mews I, Bergmann M, Bunkowski S, et al. Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. Mult Scler 1998, 4:55-62.

73. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, et al. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. Ann Neurol 1993, 33:137-151.

74. Bruck W, Schmied M, Suchanek G, et al. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. Ann Neurol 1994; 35:65-73.

75. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. New Engl J Med 1998, 338:278-285.

76. Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. Mult Scler 1998 Jun; 4(3):93-8.

77. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med. 2006 Mar 2; 354(9):942-55.

78. Reynolds R, Roncaroli F, Nicholas R, et al. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. Acta Neuropathol. 2011 Aug; 122(2):155-70.

79. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, et al. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. Brain 1997, 120:393-399.

80. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. Brain 2003; 126:433-437.

81. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. Arch Neurol 2001; 58:65-70.

82. Howell OW, Rundle JL, Garg A, et al. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2010 Oct; 69(10):1017-33.

83. Melief J, Schuurman KG, van de Garde MD, et al. Microglia in normal appearing white matter of multiple sclerosis are alerted but immunosuppressed. Glia. 2013 Nov; 61(11):1848-61.

84. Moll NM, Rietsch AM, Thomas S, et al.Multiple sclerosis normal-appearing white matter: pathology-imaging correlations. Ann Neurol. 2011 Nov; 70(5):764-73.

85. Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, et al. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. Brain Pathol. 2003 Oct; 13(4):554-73.

86. Lindberg RL, De Groot CJ, Certa U, et al. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease--comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. J Neuroimmunol. 2004 Jul; 152(1-2):154-67.

87. Kidd D, Barkhof F, McConnel R, et al. Cortical lesions in multiple sclerosis. Brain 1999; 122:17–26.

88. Peterson JW, Bo L, Mork S, et al. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. Ann Neurol 2001; 50:389–400.

89. Brownell B, Hughes JT. The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1962; 25:315 –320.

90. Lumsden CE. The neuropathology of multiple sclerosis. In: Vinken PJ, Bruyn GW, eds. Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam: North-Holland; 1970:217–309.

91. Fisher E, Reich DS. Imaging new lesions: enhancing our understanding of multiple sclerosis pathogenesis. Neurology 2013 Jul 16; 81(3):202-3.

92. Peterson JW, Bö L, Mörk S, et al. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. Ann Neurol. 2001 Sep; 50(3):389-400.

93. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. Brain 2007 Apr; 130(Pt 4):1089-104.

94. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2010 Oct; 68(4):477-93.

95. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. Brain Pathol. 2007 Apr; 17(2):210-8.

96. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. Brain. 2005 Nov; 128(Pt 11):2705-12.

97. Howell OW, Rundle JL, Garg A, et al. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2010 Oct; 69(10):1017-33.

98. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. Brain 2011 Sep; 134(Pt 9):2755-71.

99. Optic Neuritis Study Group. The clinical profile of optic neuritis: experience of the Optic Neuritis Treatment Trial. Arch Ophtalmol 1991; 109:1673-1678.

100. Rizzo JF 3rd, Lessell S. Risk of developing multiple sclerosis after uncomplicated optic neuritis. A long term prospective study. Neurology 1988; 38:185-190.

101. Mandler RN, Davis LE, Jeffery DR, et al. Devic's neuromyelitis optica: a clinico-pathological study of 8 patients. Ann Neurol 1993; 34:162-168.

102. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology 2014 Jul 15; 83(3):278-86.

103. Kieseier BC. Assessing long-term effects of disease modifying drugs. J Neurol 2006; 253 [Suppl 6](VI):23-30.

104. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an exanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983; 33:1444-1452.

105. Rudick RA, Cutter G, Reingold S. The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sderosis trials. Mult Scler 2002; 8:359-365.

106. Fisher J et al. Multiple Sclerosis functional composite (MSFC) Administration and scoring manual. 2001. http://www.mstrust.org.uk/competencies/downloads/MSFC.pdf.

107. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. Neurology 2005 Apr 12; 64(7):1144-51.

108. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol 1983; 13:227-231.

109. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol 2001; 50:121-127.

110. Polman CH et al. Diagnostic Criteria for Multiple Scerosis: 2005 Revisions to the "McDonaldCriteria". Ann Neurolol 2005; 58:840-846.

111. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011 Feb ;69(2):292-302.

112. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. Establishment of reference values. Scand J Clin Lab Invest 1977; 37:385-390.

113. Tourtellotte WW, Booe IM. Multiple Sclerosis: The blood-brain barrier and the measurement of the novo central nervous system IgG synthesis. Neurology 1978; 28(Suppl):76.

114. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57:897-902.

115. Tintoré M, Rovira A, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. Mult Scler 2001; 7: 359-63.

116. Ghezzi A, et al. Long term follow-up of isolated optic neuritis: the risk of developing multiple sclerosis, its outcome and the prognostic role of paraclinical tests. J Neurol 1999; 246: 770-75.

117. Cohen SR, Herndon RM, McKhann GM. Radioimmunoassay of myelin basic protein in spinal fluid. N Engl J Med 1976; 295:1455.

118. Sadovnick AD, Eisen K, Ebers GC, et al. Cause of death in patients attending multiple sclerosis clinics. Neurology 1991; 41:193-196.

119. Wynn DR, Rodriguez M, Ofallon WM, et al. A reappraisal of the epidemiology of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota. Neurology 1990; 40:780-786.

120. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. Brain 2003; 126(Pt 4):770-782.

121. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. Neurology 1995; 13:119-146.

122. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. Predictive value of the early clinical course. Brain 1989; 112:1419-1428.

123. Rizvi SA, Agius MA. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. Neurology 2004; 63(12 Suppl 6):S8-14.

124. Perkin GD. A critique of steroid trials in multiple sclerosis. Neuroepidemiology 1987; 6(12):40-5.

125. Durelli L, Cocito D, Riccio A, et al. High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. Neurology 1986; 36(2):238-43.

126. Milligan NM, Newcombe R, Compston DA. A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1987; 50(5):511-6.

127. Clegg A, Bryant J, Milne R. Disease-modifying drugs for multiple sclerosis: a rapid and systematic review. Health Technol Assess 2000; 4(9):i-101.

128. Ali R, Nicholas R, Muraro PA. Drugs in development for relapsing multiple sclerosis. Drugs 2013; 73:625-650.

129. The IFNB Multiple Sclerosis Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neurology 1993; 43:655-661.

130. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. N Engl J Med 2000; 343:898-904.

131. Hughes RAC. Interferon beta-1a (REBIF) in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: the clinical results of a large multicentre study. Mult Scler 1997; 3:S020.

132. Comi G, Filippi M, Barkhof F, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. Lancet 2001; 357:1576-1582.

133. Ebers GC, PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. Lancet 1998; 352(9139):1498–504.

134. Confraveux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. Brain 1980; 103:281-300.

135. Runnmarker B, Andersen O. Prognostic factor in a multiple sclerosis incidence cohort with 25 years of follow-up. Brain 1993; 116:117-134.

136. Johnson KP et al. Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Multiple Sclerosis 2000; 6(4):255-66.

137. Greene S, Watanabe K, Braatz-Trulson J, et al. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. Biochem Pharmacol 1995; 50(6):861–7.

138. Cherwinski HM, Cohn RG, Cheung P, et al. The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. J Pharmacol Exp Ther 1995; 275(2):1043–9.

139. Ruckemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, et al. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. J Biol Chem 1998; 273(34):21682–91.

140. Korn T, Magnus T, Toyka K, et al. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide—mechanisms independent of pyrimidine depletion. J Leukoc Biol 2004; 76(5):950–60.

141. Siemasko K, Chong AS, Jack HM, et al. Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. J Immunol 1998; 160(4):1581–8.

142. O'Connor PW, Li D, Freedman MS, et al. A phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. Neurology 2006; 66(6):894–900.

143. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2011; 365(14):1293–303.

144. Lopez-Diego RS, Weiner HL. Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary. Nat Rev Drug Discov 2008; 7(11):909-25.

145. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(5-6):640-56.

146. Bielekova B, Becker BL. Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action. Neurology 2010; 74 Suppl 1:S31-40.:S31-S40.

147. Kappos L et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: recommendations for patient selection and monitoring. Lancet Neurology 2007; 6(5): 431-41.

148. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2006; 354(9):899–910.

149. Miller DH, Soon D, Fernando KT, et al. MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS. Neurology 2007; 68(17):1390–401.

150. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, et al. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. Blood 2003; 101(4):1422-9.

151. Minagar A, Alexander JS, Sahraian MA, et al. Alemtuzumaband multiple sclerosis: therapeutic application. Expert Opin Biol Ther 2010; 10(3):421–9.

152. Rowan WC, Hale G, Tite JP, et al. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes. Int Immunol 1995; 7(1):69–77.

153. Masuyama J, Yoshio T, Suzuki K, et al. Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26(hi) T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelialcell monolayers. J Exp Med 1999; 189(6):979–90.

154. Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4? regulatory T cells. Clin Immunol 2006; 120(3):247–59.

155. Stanglmaier M, Reis S, Hallek M. Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. Ann Hematol 2004; 83(10):634–45.

156. Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, et al. Alemtuzumab vs interferon beta-1a in early multiple sclerosis. N Engl J Med 2008; 359(17):1786-801.

157. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. Lancet 2012; 380(9856):1819–28.

158. Bielekova B, Richert N, Howard T, et al. Humanized antiCD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004; 101(23):8705-8. 97.

159. Rose JW, Burns JB, Bjorklund J, et al. Daclizumab phase II trial in relapsing and remitting multiple sclerosis: MRI and clinical results. Neurology. 2007; 69(8):785-9.

160. Bielekova B, Howard T, Packer AN, et al. Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis. Arch Neurol. 2009; 66(4):483-9.

161. Kieseier BC, Wiendl H, Hemmer B, et al. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. Curr Opin Neurol 2007; 20(3):286-93.

162. Kappos L, Kuhle J, Gass A, et al. Alternatives to current disease-modifying treatment in MS: what do we need and what can we expect in the future? J Neurol 2004; 251 Suppl 5:v57-v64.

163. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2010; 362(5):387–401.

164. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2010; 362(5):402–15.

165. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2012; 367(12):1098–107.

166. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT,et al.; CONFIRM Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. N Engl J Med 2012 Sep 20; 367(12):1087-97. Erratum in: N Engl J Med. 2012 Oct 25; 367(17):1673.

167. Bruck W, Wegner C. Insight into the mechanism of laquinimod action. J Neurol Sci 2011; 306(1–2):173–9.

168. Yang JS, Xu LY, Xiao BG, et al. Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. J Neuroimmunol 2004; 156(1–2):3–9.

169. Comi G, Jeffery D, Kappos L, et al. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. N Engl J Med 2012; 366(11):1000–9.

170. Vollmer T. A placebo-controlled and active comparator phase III trial (BRAVO) for relapsing remitting multiple sclerosis. Abstract 148. ECTRIMS/ACTRIMS 2011.

171. Miller DH, Thompson AJ, Filippi M. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. J Neurol 2003; 250(12):1407–19.

172. Filippi M, Rocca MA. Magnetization transfer magnetic resonance imaging of the brain, spinal cord, and optic nerve. Neurotherapeutics 2007; 4(3): 401–13.

173. Geurts JJ, Calabrese M, Fisher E, et al. Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2012; 11(12): 1082–92.

174. Agosta F, Pagani E, Caputo D, et al. Associations between cervical cord gray matter damage and disability in patients with multiple sclerosis. Arch Neurol 2007; 64(9):1302–5.

175. Optic Neuritis Study Group. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. Arch Neurol 2008; 65(6):727–32.

176. Tintore M, Rovira A, Rio J, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. Neurology 2006; 67(6):968–72.

177. Paty DW, Li DK, UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebocontrolled trial. Neurology 1993; 43(4):662–7.

178. Simon JH, Jacobs LD, Campion M, et al.; The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. Ann Neurol 1998; 43(1): 79–87.

179. Li DK, Paty DW. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis. Ann Neurol 1999; 46(2): 197–206.

180. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS: quantitative MR assessment. Neurology 2000; 54(4): 813–7.

181. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2003; 348(1):15–23.

182. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2010; 362(5):402–15.

183. Filippi M, Yousry T, Baratti C, et al. Quantitative assessment of MRI lesion load in multiple sclerosis. A comparison of conventional spin-echo with fast fluid attenuated inversion recovery. Brain 1996; 119:1349–55.

184. Simon JH, Li D, Traboulsee A, et al. Standardized MR imaging protocol for multiple sclerosis: consortium of MS Centers consensus guidelines. AJNR Am J Neuroradiol 2006; 27(2):455–61.

185. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. Brain 1997; 120(Pt 11):2059–69.

186. Sormani MP, Bonzano L, Roccatagliata L, et al. Magnetic resonance imaging as a potential surrogate for relapses in multiple sclerosis: a meta-analytic approach. Ann Neurol 2009; 65(3):268–75.

187. Miller DH, Rudge P, Johnson G, et al. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. Brain 1988; 111(Pt 4):927–39.

188. Truyen L, van Waesberghe JH, van Walderveen MA, et al. Accumulation of hypointense lesions ("black holes") on T1 spin-echo MRI correlates with disease progression in multiple sclerosis. Neurology 1996; 47(6):1469–76.

189. van Walderveen MA, Kamphorst W, Scheltens P, et al. Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. Neurology 1998; 50(5):1282–8.

190. Barkhof F, Calabresi PA, Miller DH, et al. Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. Nat Rev Neurol 2009; 5(5):256–66.

191. Cadavid D, Cheriyan J, Skurnick J, et al. New acute and chronic black holes in patients with multiple sclerosis randomised to interferon beta-1b or glatiramer acetate. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009; 80(12):1337–43.

192. Pozzilli C, Tomassini V, Marinelli F, et al. 'Gender gap' in multiple sclerosis: magnetic resonance imaging evidence. Eur J Neurol 2003; 10(1):95–7.

193. Tench CR, Morgan PS, Jaspan T, et al. Spinal cord imaging in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2005; 15(Suppl 4):94S–102S.

194. Ozturk A, Aygun N, Smith SA, et al. Axial 3D gradient-echo imaging for improved multiple sclerosis lesion detection in the cervical spinal cord at 3T. Neuroradiology 2013 Mar; 55(4):431-9.

195. Inglese M, Bester M. Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications. NMR Biomed 2010; 23(7):865–72.

196. Sasiadek MJ, Szewczyk P, Bladowska J. Application of diffusion tensor imaging (DTI) in pathological changes of the spinal cord. Med Sci Monit 2012; 18(6):RA73–9.

197. Klawiter EC, Schmidt RE, Trinkaus K, et al. Radial diffusivity predicts demyelination in ex vivo multiple sclerosis spinal cords. Neuroimage 2011; 55(4): 1454–60.

198. Inglese M, Oesingmann N, Casaccia P, et al. Progressive multiple sclerosis and gray matter pathology: an MRI perspective. Mt Sinai J Med 2011; 78(2):258–67.

199. Gilmore CP, DeLuca GC, Bö L, et al. Spinal cord neuronal pathology in multiple sclerosis. Brain Pathol 2009 Oct; 19(4):642-9

200. Adams RD, Kubik CS. The morbid anatomy of the demyelinative disease. Am J Med 1952; 12: 510–46.

201. Ikuta F, Zimmerman HM. Distribution of plaques in seventy autopsy cases of multiple sclerosis in the United States. Neurology 1976; 26: 26–28.

202. Lycklama G, Thompson A, Filippi M, et al. Spinal-cord MRI in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2003 Sep; 2(9):555-62.

203. Edwards LJ, Tench CR, Gilmore CP, et al. Multiple sclerosis findings in the spinal cord. Expert Rev Neurother 2007; 7(9):1203–11.

204. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol 2007; 6(10):903–12.

205. Nijeholt GJ, Bergers E, Kamphorst W, et al. Post-mortem highresolution MRI of the spinal cord in multiple sclerosis: a correlative study with conventional MRI, histopathology and clinical phenotype. Brain 2001; 124: 154–66.

206. Hittmair K, Mallerk R, Prayer D, et al. Spinal cord lesions in patients with multiple sclerosis: comparison of MR pulse sequences. AJNR Am J Neuroradiol 1996; 17:1555-1565.

207. Rocca MA, Mastronardo G, Horsfield MA, et al. Comparison of three MR sequences for the detection of cervical cord lesions in multiple sclerosis. AJNR J Neuroradiol 1999; 20:1710-1716.

208. Gilmore CP, Bö L, Owens T, et al. Spinal cord gray matter demyelination in multiple sclerosis-a novel pattern of residual plaque morphology. Brain Pathol. 2006 Jul; 16(3):202-8.

209. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. Lancet Neurol 2007; 6(9):805–15.

210. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. Lancet 2004; 364(9451):2106–12.

211. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. Nat Rev Neurol 2010 ;6(7):383–92.

212. Simon JH, Kleinschmidt-DeMasters BK. Variants of multiple sclerosis. Neuroimaging Clin N Am 2008; 18(4):703–16, xi.

213. Li Y, Xie P, Lv F, et al. Brain magnetic resonance imaging abnormalities in neuromyelitis optica. Acta Neurol Scand 2008; 118(4):218–25.

214. Barkhof F, Filippi M. Can MRI be a predictor of long-term clinical outcome for MS? Int MS J 1995; 2:4-9.

215. Filippi M, Bozzali M, Horsfield MA, et al. A conventional and magnetization transfer MRI study of the cervical cord in patients with MS. Neurology 2000 Jan 11; 54(1):207-13.

216. Bergers E, Bot JC, De Groot CJ, et al. Axonal damage in the spinal cord of MS patients occurs largely independent of T2 MRI lesions. Neurology 2002 Dec 10; 59(11):1766-71.

217. Agosta F, Filippi M. MRI of spinal cord in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2007; 17(Suppl 1):46S-49S.

218. Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2006; 5(2):158–70.

219. Ceccarelli A, Bakshi R, Neema M. MRI in multiple sclerosis: a review of the current literature. Curr Opin Neurol 2012; 25(4):402–9.

220. Bakshi R, Dandamudi VS, Neema M, et al. Measurement of brain and spinal cord atrophy by magnetic resonance imaging as a tool to monitor multiple sclerosis. J Neuroimaging 2005; 15(Suppl 4): 30S–45S.

221. Chen JT, Collins DL, Atkins HL, et al. Brain atrophy after immunoablation and stem cell transplantation in multiple sclerosis. Neurology 2006; 66(12):1935–7.

222. Lazeron RH, de Sonneville LM, Scheltens P, et al. Cognitive slowing in multiple sclerosis is strongly associated with brain volume reduction. Mult Scler 2006; 12(6):760–8.

223. Healy BC, Arora A, Hayden DL, et al. Approaches to normalization of spinal cord volume: application to multiple sclerosis. J Neuroimaging 2012 Jul; 22(3):e12-9.

224. Kearney H, Altmann DR, Samson RS, et al. Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. Neurology 2015 Jan 27; 84(4):367-73.

225. Filippi M, Campi A, Colombo B, et al. A spinal cord MRI study of benign and secondary progressive multiple sclerosis. J Neurol. 1996 Jul; 243(7):502-5.

226. Lukas C, Sombekke MH, Bellenberg B, et al.Relevance of spinal cord abnormalities to clinical disability in multiple sclerosis: MR imaging findings in a large cohort of patients. Radiology 2013 Nov; 269(2):542-52.

227. Rocca MA, Valsasina P, Damjanovic D, et al. Voxel-wise mapping of cervical cord damage in multiple sclerosis patients with different clinical phenotypes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013 Jan; 84(1):35-41.

228. Oh J, Zackowski K, Chen M, et al. Multiparametric MRI correlates of sensorimotor function in the spinal cord in multiple sclerosis. Mult Scler 2013 Apr; 19(4):427-35.

229. Losseff NA, Webb SL, O'Riordan JI, et al. Spinal cord atrophy and disability in multiple sclerosis. A new reproducible and sensitive MRI method with potential to monitor disease progression. Brain 1996 Jun; 119 (Pt 3):701-8.

230. Daams M, Weiler F, Steenwijk MD, et al. Mean upper cervical cord area (MUCCA) measurement in long-standing multiple sclerosis: relation to brain findings and clinical disability. Mult Scler 2014 Dec; 20(14):1860-5.

231. Horsfield MA, Sala S, Neema M, et al. Rapid semi-automatic segmentation of the spinal cord from magnetic resonance images: application in multiple sclerosis. Neuroimage 2010 Apr 1; 50(2):446-55.

232. Oh J, Seigo M, Saidha S, et al. Spinal cord normalization in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2014 Nov-Dec; 24(6):577-84.

233. Kearney H, Rocca MA, Valsasina P, et al. Magnetic resonance imaging correlates of physical disability in relapse onset multiple sclerosis of long disease duration. Mult Scler 2014 Jan; 20(1):72-80.

234. Lin X, Blumhardt LD, Constantinescu CS. The relationship of brain and cervical cord volume to disability in clinical subtypes of multiple sclerosis: a three-dimensional MRI study. Acta Neurol Scand. 2003 Dec; 108(6):401-6.

235. Valsasina P, Rocca MA, Horsfield MA, et al.Regional cervical cord atrophy and disability in multiple sclerosis: a voxel-based analysis. Radiology 2013 Mar; 266(3):853-61.

236. Agosta F, Absinta M, Sormani MP, et al. In vivo assessment of cervical cord damage in MS patients: a longitudinal diffusion tensor MRI study. Brain 2007 Aug; 130(Pt 8):2211-9.

237. Biberacher V, Boucard CC, Schmidt P, et al. Atrophy and structural variability of the upper cervical cord in early multiple sclerosis. Mult Scler 2014; Aug 19.

238. Liu W, Nair G, Vuolo L, et al. In vivo imaging of spinal cord atrophy in neuroinflammatory diseases. Ann Neurol 2014 Sep; 76(3):370-8.

239. Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, et al; Attendees of the Correlation between Pathological MRI findings in MS workshop. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2012 Apr; 11(4):349-60.

240. Furby J, Hayton T, Anderson V, et al. Magnetic resonance imaging measures of brain and spinal cord atrophy correlate with clinical impairment in secondary progressive multiple sclerosis. Mult Scler 2008 Sep; 14(8):1068-75.

241. Cohen AB, Neema M, Arora A, et al. The relationships among MRI-defined spinal cord involvement, brain involvement, and disability in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2012; 22(2):122–8.

242. Gilmore CP, DeLuca GC, Bo L, et al. Spinal cord atrophy in multiple sclerosis caused by white matter volume loss. Arch Neurol 2005; 62(12):1859–62.

243. Bakshi R, Thompson AJ, Rocca MA, et al. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. Lancet Neurol 2008; 7(7):615–25.

244. Khoury S, Bakshi R. Cerebral pseudoatrophy or real atrophy after therapy in multiple sclerosis. Ann Neurol 2010; 68(6):778-779.

245. BenedictRH, Bruce JM, DwyerMG, et al.Neocortical atrophy, thirdventricular width, and cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Arch Neurol 2006; 63(9):1301–6.

246. Houtchens MK, Benedict RH, Killiany R, et al. Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. Neurology 2007; 69(12):1213–23.

247. Sicotte NL, Kern KC, Giesser BS, et al. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. Brain 2008; 131(Pt 4):1134–41.

248. Fisher E, Rudick RA, Simon JH, et al. Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. Neurology 2002; 59(9):1412–20.

249. Zivadinov R, Bakshi R. Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2004; 14(Suppl 3):27S–35S.

250. De Stefano N, Giorgio A, Battaglini M, et al. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. Neurology 2010; 74(23):1868–76.

251. Klein JP, Arora A, Neema M, et al. A 3T MR imaging investigation of the topography of whole spinal cord atrophy in multiple sclerosis. AJNR Am J Neuroradiol 2011 Jun-Jul; 32(6):1138-42.

252. Mann RS, Constantinescu CS, Tench CR. Upper cervical spinal cord cross-sectional area in relapsing remitting multiple sclerosis: application of a new technique for measuring cross-sectional area on magnetic resonance images. J Magn Reson Imaging 2007 Jul; 26(1):61-5.

253. Bakshi R, Benedict RH, Bermel RA, et al. T2 hypointensity in the deep gray matter of patients with multiple sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study. Arch Neurol 2002; 59(1):62–8.

254. Brass SD, Chen NK, Mulkern RV, et al. Magnetic resonance imaging of iron deposition in neurological disorders. Top Magn Reson Imaging 2006; 17(1):31–40.

255. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis. The radiologically isolated syndrome. Neurology 2009; 72(9):800–5.

256. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, et al. Unexpected multiple sclerosis: followup of 30 patients with magnetic resonance imaging and clinical conversion profile. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2008; 79(2):195–8.

257. Okuda DT, Crabtree E, Mowry EM, et al. Asymptomatic spinal cord lesions predict clinical progression in Radiologically Isolated Syndrome (RIS) subjects. Neurology 2010; 74(Suppl 2):A119.

258. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, et al. Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients. Arch Neurol 2009; 66(7):841–6.

259. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. Brain 2008; 131(Pt 3):808–17.

260. Sormani MP, Rovaris M, Comi G, et al. A reassessment of the plateauing relationship between T2 lesion load and disability in MS. Neurology 2009; 73(19): 1538–42.

261. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, et al. Gray matter atrophy is related to longterm disability in multiple sclerosis. Ann Neurol 2008; 64(3):247–54.

262. Fisher E, Lee JC, Nakamura K, et al. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. Ann Neurol 2008; 64(3):255–65.

263. Zhao Y, Petkau AJ, Traboulsee A, et al. Does MRI lesion activity regress in secondary progressive multiple sclerosis? Mult Scler 2010; 16(4):434–42.

264. Li DK, Held U, Petkau J, et al. MRI T2 lesion burden in multiple sclerosis: a plateauing relationship with clinical disability. Neurology 2006; 66(9):1384–9.

265. Rio J, Comabella M, Montalban X. Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 2009; 5(10):553–60.

266. Sormani MP, De Stefano N. Defining and scoring response to IFN-β in multiple sclerosis. Nature Reviews Neurology 2013; 9:504-512.

267. Rovaris M. The definition of non-responder to multiple sclerosis treatment: neuroimaging markers. Neurol Sci 2008; 29(Suppl 2):S222–4.

268. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, et al. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. Brain 1998; 121(Pt 1):3–24.

269. Brochet B, Dousset V. Pathological correlates of magnetization transfer imaging abnormalities in animal models and humans with multiple sclerosis. Neurology 1999; 53(5 Suppl 3):S12–7.

270. Schmierer K, Scaravilli F, Altmann DR, et al. Magnetization transfer ratio and myelin in post-mortem multiple sclerosis brain. Ann Neurol 2004; 56(3):407–15.

271. van Waesberghe JH, Barkhof F. Magnetization transfer imaging of the spinal cord and the optic nerve in patients with multiple sclerosis. Neurology 1999; 53(5 Suppl 3):S46–8.

272. Filippi M, Iannucci G, Tortorella C, et al. Comparison of MS clinical phenotypes using conventional and magnetization transfer MRI. Neurology 1999; 52(3):588–94.

273. Vrenken H, Pouwels PJ, Geurts JJ, et al. Altered diffusion tensor in multiple sclerosis normalappearing brain tissue: cortical diffusion changes seem related to clinical deterioration. J Magn Reson Imaging 2006; 23(5):628–36.

274. Sbardella E., Tona F., Petsas N. et al. DTI measurements in multiple sclerosis: evaluation of brain damage and clinical implications. Mult Scler Int 2013; 2013:671730.

275. Horsfield MA, Jones DK. Applications of diffusionweighted and diffusion tensor MRI to white matter diseases – a review. NMR Biomed 2002; 15(7–8): 570–7.

276. Filippi M, Cercignani M, Inglese M, et al. Diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. Neurology 2001; 56(3):304–11.

277. Cercignani M, Iannucci G, Rocca MA, et al. Pathologic damage in MS assessed by diffusionweighted and magnetization transfer MRI. Neurology 2000; 54(5):1139–44.

278. Rovaris M, Filippi M. Diffusion tensor MRI in multiple sclerosis. J Neuroimaging 2007; 17(Suppl 1): 27S–30S.

279. Preziosa P, Rocca MA, Mesaros S, et al. Intrinsic damage to the major white matter tracts in patients with different clinical phenotypes of multiple sclerosis: a voxelwise diffusion-tensor MR study. Radiology 2011; 260(2):541–50.

280. Schmierer K, Wheeler-Kingshott CA, Boulby PA, et al. Diffusion tensor imaging of post mortem multiple sclerosis brain. Neuroimage 2007; 35(2): 467–77.

281. Calabrese M, Rinaldi F, Seppi D, et al. Cortical diffusion-tensor imaging abnormalities in multiple sclerosis: a 3-year longitudinal study. Radiology 2011; 261(3):891–8.

282. Hannoun S, Durand-Dubief F, Confavreux C, et al. Diffusion tensor-MRI evidence for extra-axonal neuronal degeneration in caudate and thalamic nuclei of patients with multiple sclerosis. AJNR Am J Neuroradiol 2012; 33(7):1363–8.

283. Bakshi R, Ariyaratana S, Benedict RH, et al. Fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging detects cortical and juxtacortical multiple sclerosis lesions. Arch Neurol 2001; 58(5):742–8.

284. Calabrese M, Battaglini M, Giorgio A, et al. Imaging distribution and frequency of cortical lesions in patients with multiple sclerosis. Neurology 2010; 75(14): 1234–40.

285. Mainero C, Benner T, Radding A, et al. In vivo imaging of cortical pathology in multiple sclerosis using ultra-high field MRI. Neurology 2009; 73(12):941–8.

286. Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical demyelination in multiple sclerosis: a substrate for cognitive deficits? J Neurol Sci 2006; 245(1–2):123–6.

287. Koch M, Uyttenboogaart M, Polman S, et al. Seizures in multiple sclerosis. Epilepsia 2008; 49(6):948–53.

288. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. Arch Neurol 2009; 66(9):1144–50.

289. Derfuss T. Personalized medicine in multiple sclerosis: hope or reality? BMC Med 2012; 10:116.

290. Filippi M, Rocca MA, Comi G. The use of quantitative magnetic-resonance-based techniques to monitor the evolution of multiple sclerosis. Lancet Neurol 2003; 2(6):337–46.

291. Wattjes MP, Lutterbey GG, Gieseke J, et al. Double inversion recovery brain imaging at 3T: diagnostic value in the detection of multiple sclerosis lesions. AJNR Am J Neuroradiol 2007; 28(1):54–9.

292. Lacruz F, Artrieda M et al. The anatomical basis of somaesthetic temporal discrimination in humans. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry 1991; 54: 1077-1081.

293. Burke D, Gandevia SC, McKeon B, and Skuse NF. Interactions between cutaneuos and muscle afferent projections to cerebral cortex in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1982; 54: 349-360.

294. Costa J, Valls-Solè J et al. Subcortical interactions between somatosensory stimuli of different modalities and their tempoal profile. J Neurophysiol 2008; 100: 1610-1621.

295. Graham FK. Attention: the heartbeat, the blink, the brain. In: Campbell BA, Hayne H, and Richardson R editors. Attention and Processing Information in Infants and Adults: Perspective from Human and Animal Research. Hillsdale, NJ: Erlbaum; 3-9, 1992.

296. Braff DL, Grillon C, Geyer MA. Gating and habituation of startle reflex in schizophrenic patients. Arch Gen Psychiatry 1992; 49: 206-215.

297. Pastor MA, Day BL, Macaluso E. et al. The functional neuroanatomy of temporal discrimination. J Neurosci 2004; 24: 2585-2591.

298. Lewis PA, Mial RC. A right hemispheric prefrontal system for cognitive time measurement. Behav Processes 2006; 71: 226-234.

299. Koch G, Oliveri M, Carlesimo GA, Caltagirone C. Selective deficitof time perception in a patient with right prefrontal cortex lesion. Neurology 2002; 59: 1658-1659.

300. Koch G, Oliveri M,and Caltagirone C. Neural networks engaged in milliseconds and seconds time processing: evidence from transcranial magnetic stimulation and patients with cortical or subcortical dysfunction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009; 364: 1907-1918.

301. Koch G, Brusa L, Caltagirone C et al. Subthalamic deep brain stimulation improves time perception in Parkinson's disease. Neuroreport 2004; 15 (6): 1071-1073.

302. Ivry RB, Spencer RM, Zelznik HN, Diedrichsen J. The cerebellum and event timing. Ann N Y Acad Sci 2002; 978: 302-317.

303. Koch G, Oliveri, Torriero S et al. Repetitive TMS of cerebellum interferes with millisecond time processing. Exp Brain Res 2007; 179: 291-299.

304. Harrington DL, Haaland KY, Knight RT. Cortical networks underlying mechanisms of time perception. J Neurosci 1998; 18: 1085-1095.

305. Pastor MA, Macaluso E, Day BL, and Frackowiak RSJ. The neural basis of temporal auditory discrimination. NeuroImages 2006; 512-520.

306. Chiba A, Oshio K, and Inase M. Neuronal representation of duration discrimination in the monkey striatum. Physiological Reports 2015; 3: e12283.

307. Schwartze M, Stockert A, and Kotz Sa. Striatal contributions to sensory timing: Voxel-based lesion mapping of electrophysiological markers. Cortex 2015; 71: 332-340.

308. Jahanshahi M, Jones CRG, Dirnberger G, and Frith CD. The Substantia Nigra Pars Compacta and Temporal Processing. The Journal of Neuroscience 2006; 26847: 12266-12273.

309. Conte A, Khan N, Defazio G, Rothwell JC, and Berardelli A. Pathophysiology of somatosensory abnormalities in Parkinson disease. Nat Rev Neurol 2013; 9: 687-697.

310. Conte A, Modugno N, Lena F, Dispenza S et al. Subthalamic mucleus stimulation and somatosensory temporal discrimination in Parkinson's disease. Brain 2010; 133: 2656-2663.

311. Conte A, Rocchi L, Nardella A et al. Theta-Burst Stimulation-Induced Plasticity over Primary Somatosensory Cortex Changes Somatosensory Temporal Discrimination in Healthy Humans. PLos ONE 2012; 7 (3): e32979.

312. Rocchi L. et al. Somatosensory temporal Discrimination Threshold Involves Inhibitory Mechanisms in the Primary Somatosensory Area. J Neurosci 2016; 36 (2): 325-335.

313. Chapman CE, Bushnell MC, Miron D et al. Sensory perception during movement in man. Exp Brai Res 1987; 68: 516-524.

314. Brown H, Adams RA, Parees I et al. Active inference, sensory attenuation and illusions. Cogn Process 2013; 14: 411-427.

315. Jurayle G, Heed T, Spence C, and Roeder B. Neural correlates of tactile perception during pre-, peri-, and postmovement. Exp Brain Res 2016; 234: 1293-1305.

316. Hagura N, Kania R, Orgs G, and Haggard P. Ready steady slow: action preparation slows the subjective passage of time. Proc Biol Sci 2012; 279: 4399-4406.

317. Tomassini A, Gori M, Burr D et al. Active movement restores veridical event-timing after tactile adaptation. J Neurophysiol 2012; 108: 2092-2100.

318. Angel, R. W., and R. C. Malenka. Velocity-dependent suppression of cutaneous sensitivity during movement. Exp.Neurol 1982; 77:266–274.

319. Milne, R. J., A. M. Aniss, N. E. Kay, and S. C. Gandevia. Reduction in perceived intensity of cutaneous stimuli during movement: a quantitative study. Exp. Brain Res. 1988; 70:569–576.

320. Shergill, S. S., P. M. Bays, C. D. Frith, and D. M. Wolpert. Two eyes for an eye: the neuroscience of force escalation. Science 2003; 301:187

321. Dassonville, P. Haptic localization and the internal representation of the hand in space. Exp. Brain Res. 1995; 106:434–448.

322. Watanabe, J., M. Nakatani, H. Ando, and S. Tachi. Haptic localizations for onset and offset of vibro-tactile stimuli are dissociated. Exp. Brain Res. 2009; 193:483–489.

323. Maij, F., E. Brenner, and J. B. Smeets. Temporal uncertainty separates flashes from their background during saccades. J. Neurosci. 2011; 31:3708–3711.

324. Conte A, Belvisi D, Manzo N et al. Understanding the link between somatosensory temporal discrimination and movement execution in healthy subjects. Physiol Reports 2016; 4 (18): e12899.

325. Conte A, Belvisi D, Tartaglia M et al. Abnormal Temporal Coupling of Tactile Perception and Motor Action in Parkinson's Deisease. Front Neurol 2017; Jun 6;8:249.

326. Rocchi L, Conte A, Bologna M et al. Somatosensory temporal discrimination threshold is impaired in patients with multiple sclerosis. Letter to the Editor Clinical Neurophysiology 2016; 127: 1940-1941.

327. Lansley J. et al. Localized grey matter atrophy in multiple sclerosis: A meta-analysis of voxel-based morphometry studies and associations with functional disability. Neuroscience and Biobehavioural Review 2013; 37: 819-830.

328. Debernard L. et al. Deep grey matter MRI abnormalities and cognitive function in relapsing-remittent multiple sclerosis. Psychiatry Reserach: Neuroimaging 2015; 234: 352-361.

329. Batista S. et al. Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. J Neurol 2012; 259: 139-146.

330. Houtchens MK. Et al. Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. Neurology 2007; 69 (12): 1213-1223.

331. Bever CT, Gratten L et al. The brief repeatible battery of neuropsycological tests for multiple sclerosis: a preliminar serial study. Multiple Sclerosis Journal 1995; 1(3): 165-169.

332. Agostino R, Iezzi E, Dinapoli L et al. Effects of 5Hz subthreshold magnetic stimulation of primary motor cortex on fast finger movements in healthy subjects. Exp Brain Research 2007; 180: 105-111.

333. Wajda DA, and Sosnoff JJ. Cognitive-Motor Interference in Multiple Sclerosis: A Systematic Review of Evidence, Correlates, and Consequences. Biomed Res Int 2015: 720856.

334. Leone C, Patti F, and Feys P. Measuring the cost of cognitive-motor dual tasking during walking in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal 2015; 21(2):123-31.

335. Prosperini L, Castelli L, Sellitto G et al. Investigating the phenomen of “cognitive-motor interference” in multiple sclerosis by means of dual-task posturography. Gait 2015; 41:780-785.