UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze per la Salute
XXIII ciclo
MED 07 / MED 04

"Ruolo dei recettori metabotropici per il glutammato nei modelli animali di sclerosi multipla e prospettive terapeutiche per i pazienti con sclerosi multipla"

Tutor/Relatore
Chiar.mo Prof. Roberto Di Marco

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Guido Maria Grasso

Candidata
Dott.ssa Serena Notartomaso
Matricola:54903

Anno accademico 2009 – 2010

"In te sono stato l'albume, uovo, pesce, le ere sconfinate della terra, ho attraversato nella tua placenta, fuori di te sono contato a giorni. In te sono passato da cellula a scheletro un milione di volte mi sono ingrandito, fuori di te l'accrescimento è stato immensamente meno. Sono sgusciato dalla tua pienezza senza lasciarti vuota perchè il vuoto l'ho portato con me. Da te ho preso le voci del mio luogo, le canzoni, le ingiurie, gli scongiuri, da te ho ascoltato il primo libro… Mi hai messo in bocca tutte le parole a cucchiaini, tranne una: Mamma. Quella l'inventa il figlio sbattendo le due labbra quella l'insegna il figlio"….a TE GRAZIE

INDICE

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DEL MOLISE ..... - 0 -
INTRODUZIONE ..... - 4 -
1.1 La Sclerosi Multipla ..... - 4 -
1.2 Cenni storici ..... - 5 -
1.3 Epidemiologia ..... - 9 -
1.4 Eziopatogenesi ..... - 9 -
1.5 Patogenesi ..... - 12 -
1.6 Aspetti neuropatologici ..... - 14 -
1.7 Fisiopatologia ..... - 15 -
1.8 Aspetti clinici ..... - 16 -
1.8.a Varianti cliniche ..... - 17 -
1.9 Diagnosi ..... - 19 -
1.10 Terapia ..... - 21 -
1.11 L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE) ..... - 23 -
1.12 Decorso clinico dell'EAE ..... - 24 -
1.13 Ruolo del sistema immunitario nella patogenesi della encefalite allergica sperimentale . - 26 -
1.13 a Linfociti T ed il loro ruolo nell'EAE ..... - 26 -
1.13 b Linfociti T_H17 ed il loro ruolo nell'EAE ..... - 27 -
1.13.c Linfociti B ..... - 28 -
1.13.d Cellule presentanti l'antigene (APCs) e EAE ..... - 29 -
1.14 Recettori Metabotropici del glutammato ..... - 29 -
2.1 SCOPO DELLO STUDIO ..... - 32 -
MATERIALI E METODI ..... - 34 -
3.1 Animali ..... - 34 -
3.2 Induzione dell'EAE e trattamento in vivo con ..... - 35 -
PHCCC ..... - 35 -
3.3 Quantificazione della malattia e del grado di disabilità ..... - 36 -
3.4 Istologia ed immunoistochimica ..... - 37 -
3.5 Isolamento e stimolazione di leucociti ..... - 38 -
3.6 Citoflurimetria ..... - 40 -
3.7 rRT-PCR, sintesi di siRNA e transfezione ..... - 40 -
3.8 Analisi Western Blot e determinazione ..... - 41 -
di citochine ..... - 41 -
3.9 Determinazione dei livelli intracellulari di ..... - 41 -
cAMP e extracellulari di glutammato ..... - 41 -
3.10 Analisi Statistica ..... - 42 -
RISULTATI ..... - 43 -
4.1 La mancanza del recettore mglur4 peggiora l'andamento dell' EAE ..... - 43 -
4.2 Il profilo d'espressione delle citochine nell'EAE è influenzata dalla segnalazione del recettore mGlu4 ..... - 43 -
4.3 Espressione di Grm4 nelle cellule del sistema immunitario ..... - 44 -
4.4 Il recettore mGlu4 è richiesto dalle cellule DCs per dirigere la differenziazione delle cellule T Helper ..... - 45 -
4.5 Il recettore mGluR4 modula i livelli di cAMP nelle cellule Dendritiche ..... - 46 -

4.6 L'attivazione del recettore mGluR4 contribuisce alla resistenza allo sviluppo dell'EAE in vivo..... - 47 -
5.1 CONCLUSIONE ..... - 49 -
TABELLE E FIGURE ..... - 51 -
BIBLIOGRAFIA ..... - 68 -

INTRODUZIONE

1.1 La Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) o Sclerosi a Placche [1] è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante a patogenesi autoimmune che colpisce il Sistema Nervoso Centrale (SNC). Per malattia demielinizzante si intende un gruppo di patologie caratterizzate da un'alterazione dei meccanismi omeostatici dell'organismo mediata da una noxa patogena acquisita che colpisce la mielina normalmente costituita del SNC: si tratta quindi di una malattia che distrugge la mielina normalmente strutturata e viene pertanto anche definita come malattia mielinoclastica.

La componente essenziale delle cellule nervose è la mielina, costituita dalla membrana plasmatica prodotta dagli oligodendrociti, che avvolge a guisa di manicotto l'intero assone a partire dal cono di emergenza permettendo la trasmissione rapida e integra degli impulsi nervosi. Dal punto di vista biostrutturale la mielina è costituita dal 70-80% di lipidi e dal 20-30% di proteine che costituiscono gli antigeni della mielina; questo sbilanciamento verso i lipidi è necessario per svolgere la propria funzione di isolante elettrico e garantire la propagazione saltatoria dell’impulso nervoso. Lungo l'assone la guaina mielinica si riduce lasciando dei punti scoperti (nodi di Ranvier): è a questo livello che la corrente ionica, che si trasmette elettronicamente nelle porzioni mielinizzate dell'assone, si rigenera dando luogo al fenomeno della conduzione saltatoria. Un'affezione che colpisca o alteri la costituzione della mielina, è in grado di interferire con la conduzione nervosa dell'assone colpito, che passa da una velocità di 100 m/s a 5 m/s e quindi determina sintomi e segni neurologici.

1.2 Cenni storici

Il primo caso di SM descritto risale al XIV secolo [2], testi storici riferiscono di Santa Lidwina di Schiedam (1380-1433) che era affetta da una malattia disabilitante, con numerosi tratti in comune con la SM.

La malattia di Santa Lidwina iniziò all'età di 16 anni, in concomitanza con una caduta, mentre stava pattinando. Da allora in avanti, ella sviluppò una progressiva difficoltà nella deambulazione, cefalea e violenti dolori ai denti.

Dall'età di 19 anni, entrambe le gambe erano paralizzate e la sua visione era gravemente compromessa. Nei successivi 34 anni, le condizioni di Lidwina si deteriorarono progressivamente, sebbene con transitori periodi di remissione, fino a quando morì, all'età di 53 anni. I sintomi di Santa Lidwina erano simili a quelli che si osservano comunemente nella SM; lo stesso vale per l'età di insorgenza, la durata ed il decorso della malattia.

La seconda testimonianza nota di un caso di SM è riferibile al XIX secolo da Sir Augustus d'Esté (1794-1848), che fu il primo a raccontare, in un diario il decorso dei suoi 26 anni di malattia.

Il primo importante traguardo verso il riconoscimento della patologia della SM è arrivato con una scoperta da parte di Robert Carswell (1793-1857) [3]:, un patologo della metà del XIX secolo. Durante l'autopsia di un individuo, Carswell rilevò la presenza di strane lesioni, localizzate a livello del midollo spinale. Ignaro di cosa fossero tali lesioni, egli registrò meticolosamente il loro aspetto macroscopico.

Jean Cruveilhier (1791-1874) fu un importante anatomopatologo che descrisse gli aspetti anatomo-patologici delle lesioni osservate nella SM [4]. Il contributo che Cruveilhier ha portato sta nella descrizione del decorso clinico di una paziente nella quale più tardi riscontrò quel tipo di lesioni. Cruveilhier descrisse come nel corso

degli anni la paziente sviluppò un deficit di forza ingravescente a entrambe le gambe, braccia, spasmi, disfagia, disturbi visivi. Nel 1849, il patologo tedesco Friedrich Theodor von Frerichs (1819-1885) compì un importante passo in avanti nella diagnosi della SM [5]. Frerichs, sulla base della descrizione fornita da Cruveilhier, individuò le caratteristiche chiave della malattia e alcuni sintomi specifici. Frerichs, per primo, riconobbe nella remissione una caratteristica tipica della SM. Inoltre,egli descrisse il nistagmo come un sintomo della malattia, sintomo che qualche anno più tardi fu inserito nella famosa triade di Charcot. Inoltre, Frerichs fornì un importante contributo nel descrivere per primo i disturbi mentali della SM, riconoscendo il possibile impatto della malattia sulle funzioni cognitive e sulle funzioni cerebrali superiori .

Ulteriori approfondimenti sulla fisiopatologia della SM sono stati forniti da Eduard Rindfleisch (1836-1908), un patologo tedesco del XIX secolo, che analizzò i campioni post-mortem di pazienti SM. Nel 1863,Rindfleisch fornì numerose caratteristiche basilari che aprirono poi la strada alle teorie del coinvolgimento infiammatorio nell'eziologia della SM.

Jean-Martin Charcot (1825-1893) è stato un eminente neurologo francese del XIX secolo che lavorò all'ospedale Salpêtrière di Parigi. Senza dubbio, Charcot è stato uno dei più importanti protagonisti della storia della SM e i suoi studi costituirono un enorme passo in avanti per una conoscenza più approfondita della SM. La definitiva descrizione clinica della SM è del 1868, anno nel quale Jean Martin Charcot espose, nelle sue “lezioni del martedì”, alla Salpêtrière, le correlazioni anatomo-cliniche della malattia. Charcot infatti è stato il primo a porre una correlazione definitiva tra la sintomatologia fino ad allora misteriosa della SM e le sue alterazioni patologiche viste nei campioni post-mortem [5]. Per la prima volta, quasi 40 anni dopo la scoperta delle lesioni, la condizione clinica fu descritta da Charcot come “sclerosi a

placche” e la SM riconosciuta come entità distinta di malattia. Il contributo di Charcot si è distinto per lo sviluppo dei criteri diagnostici, che includevano la famosa triade di Charcot (nistagmo, tremore intenzionale e parola scandita) che egli osservò nella sua domestica.

Charcot ha fornito anche la prima descrizione istologica completa delle lesioni della SM, soffermandosi su caratteristiche molto importanti delle lesioni, tra cui la perdita della mielina e la proliferazione delle fibre gliali e dei nuclei.

Pierre Marie, (1853-1940) era il più grande allievo di Charcot. Al tempo dello studio di Marie sulla SM, il quadro patologico e i sintomi clinici erano già noti. Tuttavia, la causa della SM rimaneva ancora un mistero. Le scoperte di Louis Pasteur sui microrganismi e l'immunologia spinsero Marie a rivedere la SM sotto una nuova prospettiva. Nel 1884, Marie compì un ulteriore ed importante passo nella storia della SM, suggerendo per la prima volta che la malattia potesse essere causata da un agente infettivo [6]. Più di un secolo dopo, la causa della SM è ancora sconosciuta ma un elemento infettivo nell'eziologia della SM viene oggi considerato probabile, sottolineando dunque l'importanza del contributo di Marie.

Il fatto che la demielinizzazione sia presente all'interno delle lesioni dei pazienti affetti da SM era già noto grazie alle ricerche effettuate da Charcot, ma quali fossero gli effetti di tale fenomeno rimase sconosciuto fino al 1944.

Derek Denny-Brown (1901-1981), un professore di Neurologia che lavorava a Harvard, USA, fornì una risposta a tale interrogativo, attraverso esperimenti effettuati su nervi periferici danneggiati [6]. Denny-Brown osservò che quando un nervo danneggiato viene stimolato, esso non è più in grado di condurre l'impulso nervoso fino al muscolo. Egli concluse, quindi, che la demielinizzazione associata alla lesione del nervo era responsabile del blocco di conduzione. La demielinizzazione era, perciò, in grado di bloccare o rallentare la conduzione

dell'impulso lungo il nervo. Estrapolando queste osservazioni, effettuate sul nervo periferico, e applicandole nel contesto del SNC in corso di SM, si poteva concludere che la demielinizzazione osservata a livello delle lesioni SM fosse responsabile della compromissione della conduzione nervosa a livello del nervo, all'interno dell'encefalo e del midollo spinale,

Per tutto il XX secolo, la ricerca continuò a indagare su quale fosse l'esatta fisiopatologia della SM, con metodi investigativi che sono divenuti sempre più sofisticati, parallelamente allo sviluppo tecnologico. Nel corso del 1940, il Dr. Elvin A. Kabat (1914-2000) esaminò la risposta immunitaria osservata nella SM [7]. Presso il Dipartimento di Neurologia della Columbia University, USA, Kabat utilizzò il metodo dell'elettroforesi, di recente scoperta, per studiare i sieri di pazienti affetti da SM. Kabat confrontò il tracciato elettroforetico delle proteine del liquido cefalo-rachidiano (LCR) con quello del siero di pazienti affetti da SM ed evidenziò che il LCR dei pazienti con SM presentava un aumento relativo delle gamma-globuline.

Le ricerche effettuate da Kabat confermarono la natura immunologica della SM, un concetto postulato già dall'inizio del XIX secolo. Le ricerche successive hanno tentato di spiegare il motivo per il quale il sistema immunitario genera questa risposta inappropriata e i potenziali trattamenti si sono focalizzati sul tentativo di sopprimere l'attività immunologia che porta alla demielinizzazione.

Lo sviluppo di nuove tecniche di immagine, come la tomografia assiale computerizzata (TAC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN), hanno permesso di compiere enormi passi in avanti in numerose aree di ricerca in campo medico.

1.3 Epidemiologia

La SM è la più frequente malattia che colpisce i giovani adulti, manifestandosi più frequentemente tra i 20 e i 40 anni e tra le donne in un rapporto di due a uno rispetto agli uomini. La SM rappresenta la causa più comune di invalidità neurologica acquisita in questa fascia di età. Nel mondo ci sono circa 1,3 milioni di persone con SM, nella nostra area geografica, questa malattia ha una prevalenza di 81,5/100.000 abitanti ed un'incidenza di 4-5 nuovi casi all'anno per 100.000 abitanti [8]. La diffusione della SM non è uniforme nelle diverse aree geografiche: in linea generale, infatti, la prevalenza aumenta nelle zone lontane dall'equatore a clima temperato.

La SM è molto diffusa tra le popolazioni caucasiche e Nord Americane, nel sud dell'Australia e in Nuova Zelanda (prevalenza 30-80/100.000), è rara nei paesi asiatici (con prevalenze che vanno da 2/100.000 nei paesi dell'Asia Orientale a 5-29/100.000 nei paesi dell'Asia Occidentale) [9]. L'Italia viene classificata come aree a bassa prevalenza (<10/100.000), anche se alcune zone rappresentano dei veri e propri focolai della malattia, come ad esempio la Sardegna, in cui la prevalenza della malattia è di 140/100.000 abitanti [12].

1.4 Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi della SM è tuttora ignota: viene definita come una patologia multifattoriale, in quanto l'insorgenza è data dall'associazione di una suscettibilità di tipo genetico a fattori ambientali, quindi non si può identificare in un solo agente la causa determinante la sclerosi multipla.

Dal punto di vista genetico è stato osservato che i familiari di primo grado di pazienti affetti da SM presentano un aumentato rischio di sviluppare la malattia rispetto alla popolazione generale. Tale evidenza, unitamente a precedenti studi epidemiologici, ha stimolato numerose ricerche in ambito genetico, questo a permesso di rilevare una regione cromosomica associata alla malattia: si tratta della regione del DNA dove si trova il complesso che codifica il sistema degli antigeni leucocitari umani (HLA), che presentano gli antigeni ai linfociti T. In particolare questi studi hanno evidenziato, un associazione con l'aplotipo DRB1*1501 dell'allele DR2 nel complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul braccio corto del cromosoma 6 [13]. In altri gruppi etnici, la SM è associata ad altri aplotipi HLA: per es. in Sardegna con il DR4 [14].

Il cambiamento della prevalenza nella SM che si riscontra nelle diverse aree geografiche, è si attribuibile ai fattori genetici, considerando che le aree ad alto rischio alto sono a prevalenza di popolazione caucasica, ma è importante sottolineare la rilevanza dei fattori ambientali. L' importanza dei fattori ambientali è stata dimostratan da studi effettuati su migranti, che hanno dimostrato che, se un soggetto, proveniente da un'area geografica con un determinato tasso di prevalenza, si trasferisce in un'area con un tasso di prevalenza differente, non è in grado di acquisire il rischio di malattia dell'area di immigrazione almeno che il trasferimento non avvenga nella prima pubertà (15 anni).

Da quanto sopra esposto appare evidente come l'eziologia di questa malattia sia legata probabilmente a molteplici fattori ambientali, e comunque ancora non ben identificati, che interagirebbero con una predisposizione genetica durante l'infanzia-adolescenza. Tra i fattori esogeni, sono stati sospettati in particolar modo le infezioni virali dal momento che è noto che infezioni virali possono scatenare le riesacerbazioni di SM o peggiorare sintomi preesistenti.

Gli agenti maggiormente implicati sono il virus del morbillo, il virus della parotite ed altri paramyxovirus, gli Herpes virus (in particolare HHV-6 e EBV), i Corona virus e i virus para-infuenzali, i virus di Epstein-Barr, HTLV-1, e i Theiler's virus e piu generalmente tutti i virus provvisti di tropismo verso il sistema nervoso centrale in grado di causare demielinizzazione.

Recentemente l'infezione da Chlamydia pneumoniae è stata associata alla sclerosi multipla, poiché essa è stata ritrovata nel FCS (fluido cerebro-spinale) di alcuni pazienti affetti da tale patologia [15].

Nonostante sia stato impossibile finora identificare alcun virus quale agente eziologico della SM, non si può tuttavia escludere un ruolo delle infezioni virali come causa primaria o secondaria di demielinizzazione in individui geneticamente predisposti a risposte (auto)immunitarie.

Sono stati ipotizzati diversi meccanismi di azione dei virus:

a) l'azione diretta del virus, nella quale una volta superata la barriera ematoencefalica, il virus si localizza nella cellula ospite dove rimane in latenza, riattivandosi in occasioni di depressioni del sistema immunitario, provocando danni alla mielina;

b) il mimetismo molecolare, che avviene quando il patogeno esogeno viene processato da cellule specializzate e a causa di omologie di sequenze amminiche con peptidi endogeni i linfociti T risultano in grado di reagire simultaneamente con i determinanti antigenici condivisi sia dal virus che dalla mielina.

Quale che sia la causa iniziale della malattia, l'aspetto fondamentale del meccanismo patogenetico è rappresentato dalla disregolazione autoimmunitaria; i linfociti T autoreattivi nei confronti della mielina giuderebbero il processo infiammatorio con secondario coinvolgimento dei macrofagi e conseguente distruzione della mielina.

1.5 Patogenesi

Il processo patogenetico della SM dipende da fenomeni di auto-immunità. La reazione auto-immune diretta contro la mielina del SNC potrebbe essere scatenata da uno o più antigeni self proteici contenuti nella mielina, come la proteina basica della mielina (MBP), la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina della mielina oligodendrocitica (MOG) e la proteina proteolitica (PLP) [16]. Le lesioni istologicamente riscontrate sono classificate in acute e croniche, attive ed inattive: le più recenti (acute attive) mostrano una distruzione della guaina mielinica con risparmio assonale, in una zona formata dalla confluenza di piccoli foci di infiltrato perivenoso (cellule mononucleate).

Le lesioni in fase attiva sono evidenziabili da un focolaio edematoso e da un infiltrato perivascolare contenente leucociti mononucleati comprendenti linfociti T, linfociti B, plasmacellule e macrofagi che esercitano il loro potenziale patogenico attraverso meccanismi di citotossicità e rilascio di citochine proinfiammatorie di tipo 1 (Th1) quali IL-1 (interleuchina-1), IL-2, IL-12, IL-18, IFN-γ (interferon gamma), TNF-α tumor necrosis factor) TNF-α, coinvolti nel danneggiamento della guaina mielinica. Si ritiene che la causa diretta della formazione di infiltrato perivascolare, nonché il primo evento che porta alla demielizzazione, consista in un danno alla barriera ematoencefalica (BEE) con conseguente aumento della permeabilità della stessa barriera all'acqua e alle proteine plasmatiche [17]. Le lesioni della SM, si sviluppano attraverso i passi patogenetici fondamentali rappresentati da:

1. Attivazione dei linfociti T, in particolare CD4+ del fenotipo proinfiammatorio Th1 e di monociti a livello periferico.

2. Adesione dei linfociti T alle cellule endoteliali e transmigrazione attraverso la BEE.

3. Inizio della risposta immune locale nel parenchima del SNC da parte dei linfociti T attivati.

4. Danno della mielina.

L'ipotesi patogenetica è che un insulto immunitario aspecifico attivi linfociti T autoreattivi contro antigeni della mielina del SNC; questi, mediante la liberazione di citochine infiammatorie determinano l'incremento dell'espressione di molecole di adesione della famiglia delle integrine (V-CAM, VLA-4) sulle cellule endoteliali della BEE. Il riconoscimento di queste molecole e il loro legame con le controparti presenti sui linfo-monociti (I-CAM) determinano la liberazione di enzimi litici (metallo-proteasi e gelatinasi) che, scindendo le giunzioni strette endoteliali, determinano la caratteristica alterazione della permeabilità della BEE con conseguente diapedesi delle cellule immunitarie [18].

A livello della sostanza bianca del SNC, cellule microgliali residenti e macrofagi di derivazione ematogena attivati svolgono la funzione di cellule presentanti l'antigene (APC), inducendo la reazione infiammatoria contro la mielina. A questo punto i linfociti T attivati, stimolano i linfociti B a produrre anticorpi solubili (effettori di danno via citotossicità anticorpo dipendente), secernono TNF-α e INF-γ, liberano fattori del complemento, stimolano i macrofagi a liberare IL-1, TNF- α ed enzimi proteolitici, ossido nitrico (NO) e radicali liberi dell'ossigeno (ROS); si realizza così il danno al complesso mielina-assone e il conseguente rallentamento-blocco della conduzione nervosa.

La presenza negli infiltrati delle placche di linfociti T, linfociti B, plasmacellule (B attivati), leucociti ed anticorpi liberi suppone una cooperazione tra risposte

autoimmuni mediate da cellule (linfociti T, macrofagi) e reazioni mediate da anticorpi liberi in grado di legarsi a specifici antigeni mielinici.

1.6 Aspetti neuropatologici

Le lesioni anatomo-patologiche, dette placche, nella SM sono rappresentate da aree di demielinizzazione e gliosi, situate a livello della sostanza bianca del SNC, con particolare interessamento dei nervi ottici, delle aree periventricolari, del corpo calloso, del tronco encefalico, del cervelletto e del midollo spinale [19].

Le placche hanno forma irregolare e volume che varia da qualche frazione di millimetro a qualche centimetro cubico; colore, margini e consistenza variano col passare del tempo. Dal punto di vista microscopico le placche sono caratterizzate da un infiltrato infiammatorio linfo-monocitario perivasale, perdita della mielina, attivazione gliale, e, nelle lesioni più gravi, perdita neuronale. Tuttavia questi aspetti sono più o meno rappresentati a seconda che si tratti di una lesione acuta/attiva o cronica/inattiva.

E' possibile schematicamente dividere lo sviluppo delle placche in 3 fasi

- la placca acuta attiva, caratterizzata da ipercellularità dovuta alla ricca presenza di infiltrati infiammatori e da reazione proliferativa astrocitaria;
- la placca inattiva, generalmente ipocellulare in cui il processo infiammatorio di lunga durata determina demielinizzazione, perdita di oligodendrociti e perdita assonale;
- la placca cronica/attiva, si presenta quando in un placca cronica, si riaccende il processo infiammatorio; caratterizzata da completa demielinizzazione

associata a rarefazione assonale, deplezione oligodendrocitaria e intensa gliosi astrocitaria.

Il primo evento che si verifica è la degenerazione delle guaine mieliniche delle fibre nervose comprese nella placca. L'analisi delle placche in stato avanzato tramite, la colorazione di Luxol per la mielina mostra alcune placche totalmente incolori, altre (placche ombra) con una debole colorazione, corrispondenti a sedi di demielinizzazione e successiva parziale remielinizzazione.

Tecniche immunoistochimiche hanno messo in evidenza che il danno assonale, presente nelle placche acute si ritrova a distanza dalla placca. Gli assoni possono apparire alterati, ridotti, presentare isolati ingrossamenti sferoidi e degenerazione walleriana. Una volta che il processo di demielinizzazione è iniziato, subentra la reazione gliale che risulta evidente già nelle placche attive, caratterizzate da elementi reattivi, ipertrofici, che gradualmente prendono l'aspetto della glia fibrosa.

Al centro della placca si assiste ad una graduale riduzione oligodendrociti, tentativo questo di ricostruzione della mielina da parte di questi ultimi, che almeno inizialmente possono portare a una incompleta remielinizzazione (placca ombra).

1.7 Fisiopatologia

Il deterioramento mielinico porta alla perdita di supporto trofico e della conduzione saltatoria con conseguente blocco di conduzione (corrispondente a perdita della funzione) o rallentamento dell'impulso nervoso, che procede per tutto l'assone. Durante la fase acuta dall'attacco si sviluppa un'area focale di infiammazione con alterazione della barriera emato-encefalica ed edema, che provoca un blocco di conduzione locale degli impulsi lungo i fasci di fibre, ne risultano sintomi negativi.

Con la risoluzione dell'infiammazione e dell'edema lesionale, nelle fasi iniziali di malattia si ha un recupero del deficit neurologico, legato anche alla riorganizzazione funzionale dell'assone e alla riemilinizzazione.

Il ripetersi del danno infiammatorio con esaurimento delle capacità di riemilinizzazione e blocco di conduzione della fibra colpita, nelle fasi più tardive della malattia porta a sintomi o segni clinici irreversibili.; questo fenomeno sembra legato ad un sovraccarico metabolico degli assoni esposti cronicamente demielinizzati, rendendoli più vulnerabili e senescenti.

1.8 Aspetti clinici

La SM rappresentando una malattia multifocale è caratterizzata da sintomi molteplici, in quanto sono il risultato di una demielinizzazione diffusa nel sistema nervoso centrale che porta ad una trasmissione elettrica deteriorata degli impulsi nervosi dalle diverse zone cerebrali. L'estrema variabilità di sintomi rende fondamentale un'esatta valutazione dello stato clinico dei pazienti al momento della visita necessaria per determinare la presenza di una riacutizzazione, o per stabilire la progressione della malattia [20].

Per avere un analisi oggettiva dello stato del paziente su utilizza la Expanded Disability Status Scale (EDSS) di Kurtzke. Nell'EDSS si analizzano 8 sistemi funzionali, ad ognuno dei quali si attribuisce un punteggio che va da 0 (esame neurologico normale) a 10 (massimo grado di gravità).

Le principali manifestazioni neurologiche all'esordio sono rappresentate da:

ipostenia ad uno o più arti 30%

neurite ottica 22%

parestesie o disestesie 18%

sintomi cerebellari (atassia) 15%

diplopia, vertigini o diturbi della minzione 10%

manifestazioni parossistiche o psichiche 5%

Nella fase precoce della malattia, gli attacchi si presentano tipicamente come una semplice perdita di funzione, una diminuzione della forza muscolare ad uno o ad entrambi gli arti, specie a carico degli arti inferiori, l'alterazione della sensibilità come intorpidimento e formicolii ad uno o a più arti, come cecità monoculare (neurite ottica), atassia o diplopia a seconda della via colpita. Oltre ai disturbi di carattere motorio e sensitivo assumono maggior rilievo i disturbi sfinterici a carico della vescica, i disturbi intestinali, quelli sessuali; vertigini con nausea e vomito, accompagnate da nistagmo, possono divenire un sintomo persistente. Si associa spesso ai disturbi sensoriali il segno di Lhermitte. Si tratta di una sensazione di scossa elettrica che percorre la schiena e gli arti inferiori in seguito alla flessione del collo.

Non vi è una forma di SM tipica: molti pazienti presentano più di un sintomo e, sebbene ve ne siano alcuni comuni, nessuno presenta tutti i sintomi rilevanti del quadro morboso.

1.8.a Varianti cliniche

Nei primi anni di malattia i segni e sintomi nei pazienti con SM tendono a scomparire e comparire. La comparsa dei sintomi viene definita “recidiva” “poussées”, termine con cui si indica una situazione di fase attiva della SM; La

scomparsa completa o incompleta dei sintomi viene invece indicata con il termine di “remissione”.

Questi attacchi si osservano quando compaiono nuovi sintomi neurologici (che perdurino per almeno 24 ore) o quando sintomi preesistenti peggiorino in modo evidente, dopo essere stati sostanzialmente stabili per almeno un mese.

Questa, nella forma più tipica, si presenta con attacchi clinici acuti seguiti da regressione sintomatologica parziale o totale e dall'assenza di progressione della disabilità durante i periodi intercritici; questa forma, che è definita a riacutizzazioni e remissioni (SM-RR), rappresenta l'80% dei nuovi casi, nonché circa il 45% in termini di prevalenza.

Una percentuale significativa (circa il 50%) di soggetti con forma classica di SM-RR progredisce, nei 10 anni successivi alla diagnosi, verso una forma di malattia secondariamente progressiva (SM-SP), che rappresenta il 35% in termini di prevalenza. Essa è caratterizzata da una progressione continua della malattia, con o senza sovrapposizione di riacutizzazioni, dopo una fase di malattia descrivibile come SM-RR.

La forma primitivamente progressiva (SM-PP) rappresenta circa il 10% delle forme e si caratterizza per l'esordio subdolo e il decorso progressivo, solitamente lento, ab inizio.

L'ultima variante (10%) è rappresentata dalla forma progressiva con riacutizzazioni (SM-PR), assimilabile per caratteristiche cliniche alla forma secondariamente progressiva, ma con decorso progressivo ab inizio.

Dal punto di vista della severità clinica, si riconosce nell'ambito della SM-RR, la variante benigna (10% dei casi), che viene definita come quella forma che a 15 anni dall'esordio ha determinato solo una minima disabilità del paziente. Esistono poi rare forme maligne (5%) con decorso rapidamente progressivo ed inabilità completa nel

giro di poche settimane o mesi. La maggior parte dei pazienti presenta pertanto una gravità intermedia tra questi due estremi.

1.9 Diagnosi

Con il miglioramento della comprensione dei meccanismi patogenetici, alla base della SM e la possibilità di nuove tecniche diagnostiche a disposizione i criteri per la diagnosi sono in continua evoluzione.

L'iter diagnostico, comunque, richiede innanzitutto un'accurata anamnesi, la quale deve essere volta ad individuare non solo le condizioni cliniche attuali del paziente, ma anche eventuali sintomi pregressi.

Successivamente deve essere eseguito l'esame obiettivo neurologico del paziente, ricercando la presenza dei segni prima descritti. Di fondamentale importanza, infine, sono anche le indagini strumentali, come la risonanza magnetica (MR) e l'esame del liquido cefalorachidiano (LCR), mentre lo studio neurofisiologico dell'encefalo e del midollo spinale con i potenziali evocati può aiutare a definire la diagnosi.

I criteri diagnostici indicati nel 2001 dalla Multiple Sclerosis International Federation (criteri di McDonald), sono stati rivisti nel 2005 [21]. I nuovi criteri introducono le recenti acquisizioni di RM, delimitando che l'alterazione di questo esame sia fondamentale per la dimostrazione della disseminazione sia spaziale sia temporale delle lesioni.

Criteri diagnostici di McDonald (2005):

Criteri di disseminazione spaziale (devono essere soddisfatti 3 criteri su 4 dei seguenti):

1. una lesione che assume gadolinio oppure almeno 9 lesioni iperintense in T2.

2. una o più lesioni sotto-tentoriali.

3. una o più lesioni juxta-corticali

4. tre o più lesioni periventricolari.

Criteri di disseminazione temporale (deve essere soddisfatto almeno 1 dei seguenti):

1. alla RM encefalo eseguita alla distanza di almeno 3 mesi dal primo episodio clinico, almeno una lesione che assuma gadolinio.

2. dimostrare, in qualsiasi momento, una nuova lesione iperintensa in T2 rispetto a una RM encefalo di riferimento fatta almeno 30 giorni dopo l'evento clinico iniziale.

L' applicazione di tali criteri porta a valutazioni diagnostiche più rapide, caratterizzate da buona sensibilità, specificità e accuratezza; il risultato finale di una valutazione può essere:

_ SM

_ non SM

_ SM possibile

Una volta effettuata l'analisi RM è importante valutare le alterazioni liquorali che confermano la natura infiammatoria delle lesioni: alterazioni delle immunoglobuline IgG (bande oligoclonali IgG all'isoelettrofocusing ed elevato IgG index) e pleiocitosi linfocitaria (<50 cell/mm3)

L'elemento più caratteristico è comunque rappresentato dalla presenza di bande oligoclonali IgG in regione gamma all'elettroforesi o immunoisoelettrofocusing del liquor. Questa alterazione è presente in circa il 90% dei pazienti con SM, ma tuttavia essa è riscontrabile anche in altre affezioni del SNC di tipo infiammatorio.

1.10 Terapia

Attualmente la SM non è guaribile, ma è, in una certa misura, curabile. La maggior parte dei trattamenti disponibili sono farmaci "sintomatici", ossia alleviano un sintomo senza però modificare i meccanismi alla base della malattia e quindi l'andamento della malattia stessa.

Esempi di trattamenti sintomatici sono:

“Bolo steroideo”: con questo termine si intende la somministrazione endovenosa ad alte dosi di glicocorticoidi (metilprednisolone 1gr/die per via e.v. per 5-10 giorni, seguito da un trattamento a scalare per o.s.) è esclusivamente indicata in caso di attacco di malattia in quanto modifica positivamente l'evento acuto, riducendo durata e gravità della sintomatologia. La sua efficacia si basa sull'attività antiedemigena e antinfiammatoria, piuttosto che immunosoppressiva. Gli effetti collaterali includono ipertensione, sensazione metallica in bocca, ritenzione idrica, bradicardia, epigastralgie, iperglicemia, umore depresso o euforia, aumentata suscettibilità alle infezioni, dismenorrea, insonnia e agitazione.

Attualmente sono a disposizione alcune terapie che possono incidere sul decorso clinico della malattia e sono definite pertanto terapie modificanti il decorso di malattia (DMA) che sono farmaci di tipo immunomodulante; ad essi si aggiungono i più classici farmaci immunosoppressori [22].

Esempio di farmaci immunomodulanti sono l’Interferone β, e il Glatiramer acetato.

Interferone β (IFN- β): gli interferoni sono una classe di glicoproteine ad azione antivirale, prodotte da cellule del sistema ematopoietico sono in grado di regolare il sistema immunitario, riducendo l’infiammazione a livello del sistema nervoso centrale e quindi l’aggressione della mielina.

L'efficacia degli IFN- β si ha nella forma a ricadute e remissioni, dove riduce il numero delle riacutizzazioini di circa il 30%; parallelamente alla RM dell'encefalo si riduce il numero di nuove lesioni attive. Più discussa, in quanto non sostenuta dalla totalità degli studi, è l'utilità dell'interferone nelle forme progressive della malattia. Gli effetti collaterali più frequenti sono rappresentati da una sintomatologia simil-influenzale (ben controllata in genere con la Tachipirina) e (soprattutto per le preparazioni sottocute) da una reazione locale nella sede dell'iniezione. Nelle ore seguenti la somministrazione del farmaco può svilupparsi astenia leucopenia depressione del tono dell'umore e incremento transitorio degli enzimi epatici. Il 10-30% dei pazienti sviluppa purtroppo, entro un anno dall'inizio del trattamento, anticorpi neutralizzanti anti-interferone (NABs). Si ritiene che la presenza di NABs ad alto titolo riduca l'efficacia clinica degli IFN- β.

Il Glatiramer acetato (GA) o copolimero-1 : è un tetrapeptide scoperto in corso di sperimentazione sull'EAE, che ha dimostrato, nelle forme RR, ha un'efficacia nella forma a ricadute e remissioni simile all'interferone dell'IFN- β. Viene somministrato quotidianamente sottocute. Gli effetti collaterali sono rappresentati da reazioni locali e, in circa ¼ dei pazienti, da un transitorio malessere (senso di oppressione toracica, palpitazioni, calore), privo tuttavia di conseguenze.

Tra i farmaci immunosoppressori troviamo il Mitoxantrone, derivato antraciclinico ad effetto antiproliferativo e proapoptotico sulle cellule immunocompetenti. Viene utilizzato per il trattamento di SM-SP e di SM-RR con elevata attività di malattia e rapido deterioramento clinico. Si utilizza per via endovenosa e determina riduzione degli attacchi e riduzione dell'attività alla RM. Discretamente tollerato, gli effetti collaterali sono una leucopenia prevedibile e reversibile, alopecia (lieve), disordini mestruali fino all'amenorrea, nausea, talora non reversibile. Solitamente nelle forme a carattere progressivo si pratica l'azatioprina: il razionale di tale terapia sta nel suo

effetto immunosopressore, i rischi sono connessi all'immunosoppressione prolungata alla possibile pancitopenia e alle alterazioni epatiche.

1.11 L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE)

L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE) è considerata il modello animale più fedele alla sclerosi multipla umana [23;24]. Grazie allo studio di animali con EAE oggi possiamo avvalorare la nostra conoscenza sulla patogenesi della SM. Essa è una sindrome autoimmune demielinizzante mediata dai linfociti T che riconoscono specificatamente alcune componenti della mielina. L'EAE può essere indotta sperimentalmente, in animali sensibili, con vari antigeni: materiale cerebrale in toto, sostanza bianca intera, midollo spinale, mielina purificata o suo sito encefalitogeno (MBP o PLP o MOG), oligodendrociti purificati e con trapianto di linfociti precedentemente attivati contro la mielina. La malattia può avere un decorso acuto o cronico a seconda del ceppo animale e dei protocolli di immunizzazione.

L'induzione di EAE viene effettuata seguendo due metodiche:

- Immunizzazione attiva indotta dall'iniezione per via generale, soprattutto intradermica di estratti cerebrali, di MBP o del sito encefalitogeno emulsionati in adiuvanti (sostanze che, somministrate con un antigene, ne aumentano l'immunogenicità), che spesso sono costituiti da un olio minerale e micobatteri (adiuvante completo di Freund);
- Trasferimento passivo di sospensioni di cellule linfoidi, isolate da animali precedentemente immunizzati, in riceventi singenici (individui dello stesso ceppo che hanno una costituzione genetica pressoché identica) o in ospiti

immunodepressi. Le cellule effettrici responsabili del trasferimento dell'EAE sono state identificate come linfociti T $CD4^{+.}$

Le indagini analitiche hanno rivelato che il principale antigene implicato nell'induzione dell'EAE è rappresentato dalla MBP o antigene M1, denominato anche proteina basica encefalitogena. Questa proteina costituisce il 30% circa del contenuto proteico totale della mielina ed è rappresentata anche nel citoplasma degli oligodendrociti (cellule sintetizzanti la mielina).

1.12 Decorso clinico dell'EAE

L'EAE è caratterizzata da un decorso clinico evidenziabile da paresi ascendente degli arti, con conseguente difficoltà alla deambulazione, perdita di peso, disturbi della minzione e delle funzioni intestinali [25]. Tali manifestazioni cliniche e anatomo-patologiche dell'EAE sono correlate non soltanto alla specie ed al ceppo, ma anche ai protocolli di immunizzazione. Si riconoscono almeno sei forme di EAE, due delle quali rivestono maggiore importanza ai fini della correlazione EAE/SM.

Nell'EAE monofasica, indotta nei ratti Lewis, i deficit neurologici compaiono fra il 9° e l'11° giorno dall'induzione, raggiungendo un picco massimo intorno al 13° giorno. Gli animali presentano un decorso della patologia di tipo monofasico con completa "restitutio ad integrum" (90% dei casi) intorno al 21-27 giorno rispetto al giorno di immunizzazione. Gli animali, raggiunta la guarigione, risultano resistenti a nuovi tentativi di re-induzione della patologia(EAE). Nella forma acuta generalizzata o monofasica, la demielinizzazione è preceduta da un'invasione da parte di piccoli linfociti del tessuto cerebrale. Questi linfociti, identificati come cellule T $CD4^{+}$, già al quinto giorno dopo l'immunizzazione cominciano ad attraversare (diapedesi)

l'endotelio dei piccoli vasi nel SNC e ad indurre alterazioni infiammatorie della mielina. Più tardivamente, cioè immediatamente prima della comparsa delle manifestazioni cliniche, compaiono in prossimità degli spazi perivascolari cellule B e macrofagi. La forma monofasica può essere indotta sia per immunizzazione attiva che per trasporto passivo.

La forma cronica o cronico-ricorrente è stata inizialmente segnalata da Stone e Lerner in alcuni ceppi di cavie, preferibilmente di sesso maschile (le femmine sono più suscettibili e presentano maggior tasso di mortalità), immunizzate in età precoce (1-2 settimane di vita) con una singola dose di midollo spinale singenico in adiuvante completo di Freund, iniettato in regione nucale. Con tale protocollo, dopo un lungo periodo di latenza (da 8 a 12 settimane) insorge una malattia a basso quoziente di mortalità che perdura, con fasi di riacutizzazione e fasi di remissione, per tutta la vita dell'animale. Modelli analoghi sono oggi disponibili nel coniglio e nel ratto. In queste forme di EAE il meccanismo di demielinizzazione è essenzialmente simile a quello delle forme monofasiche: ad ogni fase di riacutizzazione clinica corrispondono nuove ondate, a livello del SNC, di linfociti T e di macrofagi e nuove lesioni demielinizzanti vanno ad aggiungersi a quelle preesistenti; parallelamente il numero dei linfociti T attivati nel sangue periferico decresce [26]. Nelle fasi croniche o in quelle di remissione sono evidenziabili fenomeni di astrogliosi fibrosa a livello della sostanza bianca demielinizzata e ciò conferisce al parenchima cerebrale un aspetto simile a quello delle placche riscontrabili nella SM dell'uomo. In questo stadio sono presenti numerose plasmacellule e può verificarsi un certo grado di remielinizzazione. Le lesioni più piccole possono andare incontro a remielinizzazione completa, mentre le aree più estese quasi invariabilmente rimangono demielinizzate al centro.

Lo studio delle varie forme di EAE è di rilevante importanza ai fini della comprensione dei disordini demielinizzanti nell'uomo. La forma monofasica di EAE, ad esempio, è quella che più si avvicina alla variante acuta, tipo Marburg, della SM (rara), mentre la forma cronica o, meglio, cronico-ricorrente di EAE è il modello animale che, pur con molte dissimilitudini, rispecchia fedelmente la SM umana nella sua tipica e frequente forma cronica attiva.

1.13 Ruolo del sistema immunitario nella patogenesi della encefalite allergica sperimentale

1.13 a Linfociti T ed il loro ruolo nell'EAE

I linfociti T, che esprimono il marcatore di membrana $CD4^+$, sono coinvolti nel meccanismo patogenetico dell'EAE [27]. Di recente è stato osservato che anche nei topi mutanti PL/J $CD4^-$ può essere indotta L'EAE. Anche se i linfociti T CD4 siano le prime cellule effettrici nell'EAE, altri linfociti possono sottoscrivere a funzioni helper effettrici nei topi geneticamente modificati nel CD4. Le cellule T $CD4^+$ encefalotigeniche hanno dimostrato di possedere distinte proprietà citotossiche verso gli astrociti in vitro, mentre i linfociti T non encefalotigeni non mostrano la stessa capacità citotossica. A tal proposito possiamo classificarle in due famiglie: cellule encefalitogeniche (citotossiche) e cellule non-encefalitogeniche (non citotossiche). Distinte proprietà funzionali dei cloni dei linfociti T di indurre l'EAE dipendono dalla loro capacità di produrre differenti classi di molecole effettrici (citochine). Così, i cloni dei linfociti T encefalitogeni producono IFN-γ e TNF-α, mentre i cloni non encefalitogeni producono IL-4. Alla luce dei più recenti studi sui cloni di

linfociti T $CD4^+$ murini, queste scoperte si sono rivelate di particolare interesse per i quali si è proposta la classificazione in due differenti sottopopolazioni in base alle caratteristiche funzionali e di secrezione di citochine [28].

Le cellule T helper (Th)-1 secernono IL-2, IFN-γ e TNF-α o linfotossine e inducono la risposta immune, mentre i T helper (Th)-2, secernono IL-4, 5, 6, 10 e 13 e regolano i linfociti B. Diversi studi affermano che, queste sottopopolazioni sono presenti anche nell'uomo per i quali è stata proposta la definizione come linfociti T infiammatori ed helper. A queste due distinte sottopopolazioni è stato ancorato un altro clone di cellule T (Th0) che secerne entrambi i tipi di citochine Th1 e Th2 e può rappresentare il precursore dei fenotipi polarizzati Th1 e Th2. Le sottopopolazioni Th1 e Th2 interagiscono mutualmente e spesso le citochine secrete da un clone contrastano gli effetti e l'attivazione delle citochine secrete dall'altro clone.

Nell'EAE il ruolo delle cellule $CD8^+$ è poco chiaro. Alcuni studi suggeriscono il loro coinvolgimento nei meccanismi di tolleranza nonché di soppressione dell'EAE. Possono secernere entrambi i modelli di citochine, Th1-like (Tc1) e Th2-like (Tc2), e possono contribuire ad attivare i linfociti B. Recentemente è stato proposto di denominare le cellule che secernono prevalentemente TGF-β come Th3. I linfociti $CD4^+/CD8^+$, producendo prevalentemente TGF-β, hanno dimostrato che questa sottoclasse è coinvolta nella protezione dall'EAE inducendo tolleranza orale alla MBP, rispettivamente nei ratti LEWIS e nei topi SJL/J.

1.13 b Linfociti T_H17 ed il loro ruolo nell'EAE

La recente scoperta di un nuovo sottotipo di cellule effettrici, le cellule T helper (T_H17) in grado di produrre interleuchina 17, ha fornito nuovi scenari all'interno

dell' immunopatologia. Le cellule T_H17 hanno un ruolo importante nell'infiammazione e nell' autoimmunità [29; 30] e si sviluppano sotto l' influenza delle cellule regolatorie (T_{reg}). Sebbene le cellule T_H17 agiscano come mediatori nella sclerosi multipla e nel suo modello animale l'encefalomielite autoimmune sperimentale, (EAE) [31] alcuni lavori sollevano il problema su quale sottopopolazione di cellule T, tra le T_H1 e T_H17, abbia un ruolo patogenetico prominente, suggerendo che ciascuna popolazione contribuisca ad un aspetto della malattia [32]: ad esempio l'interferone-β è in grado di ridurre l'EAE sostenuta dalle cellule T_H1, ma viene esacerbata dalle cellule T_H17 [33].

1.13.c Linfociti B

I linfociti B hanno la capacità di produrre anticorpi diretti contro differenti antigeni mielinici e sono facilmente distinguibili negli infiltrati infiammatori del SNC [34]. Il ruolo cruciale che si conferisce a queste cellule nell'influenzare l'EAE, appare evidente se si considera il loro coinvolgimento nel processo di stimolazione della risposta immune iniziale cellulo-T-mediata e nel processo di demielinizzazione. Nel primo caso agiscono da APCs o secernono anticorpi anti-MBP, i quali formano complessi con le proteine ematiche che dopo trasporto ai linfonodi possono condurre all'efficiente innesco dei linfociti T. Nel secondo caso, gli anticorpi espressi sulla superficie della mielina nel tessuto danneggiato possono essere attivati mediante distruzione operata dal complemento o mediante opsonizzazione per attacco di macrofagi.

1.13.d Cellule presentanti l'antigene (APCs) e EAE

Tra le principali cellule presentanti l'antigene coinvolte nel processo infiammatorio si annoverano le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B attivati [35]. I macrofagi attivati giocano un ruolo nella fase effettrice della malattia non solo nella presentazione dell'antigene, ma anche nella produzione di mediatori proinfiammatori non specifici, che con un aumento della permeabilità vascolare favoriscono l'edema e spesso la degradazione della mielina. Queste molecole includono citochine come l'IL-1 e TNF-α, ammine vasoattive, proteasi. Inoltre, le citochine prodotte dalle APCs, come l'IL-2 e l'IL-10 costituiscono importanti fattori che partecipano all'instaurarsi della risposta immunitaria.

1.14 Recettori Metabotropici del glutammato

Il glutammato è il maggiore neurotrasmettitore eccitatorio del SNC ed agisce attraverso due classi di recettori: i recettori ionotropici ed i recettori metabotropici. Un' attivazione eccessiva dei recettori ionotropici del glutammato, che sono normalmente coinvolti nella trasmissione sinaptica eccitatoria, attraverso una eccessiva entrata di calcio nei neuroni o negli oligodendrociti, ha come conseguenza una degenerazione neuronale, chiamata eccitotossicità, che è implicata nella patogenesi di molte malattie degenerative sia acute che croniche inclusa la SM.

I recettori metabotropici del glutammato, invece, sono recettori accoppiati a proteine G, che grazie alla loro localizzazione presinaptica e postsinaptica e alla loro presenza nelle cellule gliali, modulano la trasmissione sinaptica eccitatoria e rappresentano targets importanti per farmaci rivolti alla modulazione dell'attività dei neuroni

glutammatergici e, quindi ad una possibile riduzione del danno eccitotossico. Sin dalla loro scoperta negli anni ‘80, i recettori metabotropici del glutammato (mGlu) hanno rivestito un ruolo importante nelle neuroscienze per la loro importanza nella trasmissione glutammatergica. Gli mGluR formano una famiglia di 8 sottogruppi, suddivisi in tre gruppi sulla base dell’omologia di sequenza, dei meccanismi di trasduzione e dei profili farmacologici. In particolare, i recettori metabotropici vengono divisi in: gruppo I, gruppi II e gruppo III [36].

Il gruppo I include i recettori mGlu1 e mGlu5 che sono recettori accoppiati a Gq/G11. L’attivazione di entrambi i sottotipi in cellule ricombinanti stimola l’idrolisi di PI (fosfoinositolo) con la formazione di due secondi messaggeri intracellulari, inositolo-1,4,5-trifosfato e diacilglicerolo (DAG). Ins 1,4,5-P3 rilascia calcio(Ca^2) da compartimenti intracellulari, mentre il DAG attiva la proteina chinasi C (PKC). L’attivazione dei recettori mGlu del gruppo I, inoltre, stimola la formazione di cAMP, il rilascio di acido arachidonico, l’attivazione della via delle MAP-chinasi (MAPK) e quella via del fosfatodiinositolo-3-chinasi (PI-3-K).

Il recettore mGlu1, a livello subcellulare, si ritrova in elementi postsinaptici, cellule del Purkinje e nella corteccia cerebrale, dove partecipa all’induzione della long-term depression (LTD) importante per l’apprendimento motorio.

Questo recettore è anche presente nel bulbo olfattivo, nella pars compacta della sostanza nera, nell’ippocampo e nei nuclei talamici.

L’attivazione dei recettori mGlu5, induce un aumento oscillatorio nel rilascio di calcio intracellulare. Come il recettore mGlu1 il recettore mGlu5 è localizzato negli elementi postsinaptici, dove è legato fisicamente ai recettori NMDA. L’attivazione del mGluR5 facilita l’apertura dei canali ionici NMDA dipendenti e l’attivazione dei recettori NMDA amplifica le funzioni dei recettori mGlu5 attraverso l’inibizione dei

recettori desensibilizzati (LTD mgluR1). L'mGluR5 sembra coinvolto nell'apprendimento associativo.

Del gruppo II dei recettori metabotropici del glutammato fanno parte i recettori mGlu2 e mGlu3, che sono accoppiati a proteine Gi/Go. La loro attivazione inibisce la formazione di cAMP, inibisce i canali voltaggio dipendenti del $Ca2^{+}$, attiva i canali al K^{+}, e stimola la via delle MAPK e PI-3-K. I recettori mGlu2 e mGlu3 sono omologhi, hanno funzioni e profilo farmacologico simile. Questi recettori sono maggiormente localizzati nelle regioni pre-terminali degli assoni, gli mGluR3 si trovano anche negli astrociti e microglia dove partecipano alla produzione di fattori trofici.

Il gruppo III dei recettori mGlu include i recettori mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8 che sono tutti accoppiati a proteine Gi/Go. L'attivazione del mGlu4, mGlu7, mGlu8 inibisce la formazione di cAMP e i canali voltaggio dipendenti del $Ca2^{+}$. Questi tre sottotipi recettoriali sono localizzati nelle regioni terminali degli assoni e hanno l'abilità di inibire il rilascio di neurotrasmettitori in varie sinapsi nel SNC. La loro localizzazione in prossimità della zona attiva del rilascio dei neurotrasmettitori rendono questi sottotipi degli autorecettori del glutammato.

Il recettore mGlu6 ha delle caratteristiche peculiari in quanto è localizzato esclusivamente nei dendriti delle cellule bipolari della retina. L'attivazione di questo recettore crea una iperpolarizzazione delle cellule bipolari attraverso la chiusura dei canali cationici cGMP-dipendenti. Al contrario la luce riduce la stimolazione dell'mGluR6, lasciando aperti i canali cationici e depolarizzando le cellule bipolari.

2.1 SCOPO DELLO STUDIO

Il sistema nervoso centrale e il sistema immunitario, nonostante normalmente siano anatomicamente indipendenti, sono in grado di cooordinare una varietà di risposte al pericolo attraverso comuni messaggeri chimici. Neurotrasmettitori classici, come monoammine e acetilcoline, contribuiscono alla regolazione della risposta immunitaria [37; 38].

La nostra ipotesi di studio prende origine dalla considerazione che il glutammato(Glu) rappresenta il messaggero chimico comune sia alle cellule nervose che alle cellule immunitarie e per questo candidato ad essere implicato in tale 'azione coordinata'. Recenti evidenze che suggeriscono ulteriormente come il glutammato possa essere implicato nella sinapsi immunologica. Nella sinapsi immunologica, le informazioni che si hanno sui recettori mGlu sono confermate nelle cellule T. I linfociti T umani, infatti, esprimono costitutivamente il recettore mGlu5 che sembra mediare un effetto soppressivo sulla proliferazione delle cellule T, al contrario del recettore mGluR1 la cui espressione è inducibile e media effetti costimolatori [39].

I recettori mGlu del gruppo I e del gruppo II nel topo sono presenti nel timo e appaiono essere differentemente espressi nei timociti e nelle cellule stromali timiche [40]. Inoltre all' inizio del nostro studio nessuna informazione era disponibile sull'espressione degli mGluR nelle cellule dentritiche (DCs) anche se queste cellule possono rilasciare alti livelli di glutammato attraverso gli antiporto cisteina\glutammato [39].

Tuttavia, ad oggi, manca un quadro generale sul profilo di espressione, sulle vie di segnalazione e sull'effetto che risulta dall'attivazione dei recettori metabotropici per il glutammato nelle cellule del sistema immunitario.

Nell' immunoterapia sperimentale è stato dimostrato che la somministrazione dell'agonista specifico per gli mGluR del gruppo III L-2amino-4-phono-butanoate (L-AP-4), è in grado di aumentare la velocità di guarigione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) nei ratti Lewis [41].

La disponibilità di topi deficitari nell'espressione del recettore mGlu4 e il possibile utilizzo di un nuovo modulatore allosterico positivo per mGluR4, ci ha spinto ad investigare in particolare modo il possibile coinvolgimento di recettori metabotropici del III gruppo nell' encefalomielite autoimmune sperimentale ed in generale nel loro possibile ruolo nella neuroinfiammazione.

MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Topi Grm4$^{-\backslash-}$ (B6.129-Grm4^{tm1Hpn}/J) su un background C57/BL6 sono stati purificati da The Jackson Laboratory. Topi maschi C57BL/6 di 8-10 settimane, di peso corporeo 22-24 g, sono stati acquistati da Charles River (Calco, Italy) e sono stati utilizzati come ceppo di controllo durante l'esperimento. Topi SJL/J forniti dai laboratori della Charles River Breeding sono stati utilizzati per gli esperimenti di EAE relapse-remitting. Tutti gli animali usati nello studio sono stati genotipizzati per PCR dal DNA isolato dalle code. I topi sono stati tenuti sotto condizioni ambientali controllate (temperatura ambiente, 22 °C; umidità, 40 %) in un ciclo luce/buio di 12 h con cibo e acqua ad libitum. Gli esperimenti sono stati effettuati in accordo alla normativa nazionale sulla sperimentazione animale e tutte le procedure sperimentali sono state autorizzate dal comitato etico in riferimento alla legislazione Italiana, per questo animali in stato moribondo sono stati eutanizzati tramite inalazione di CO_2.

I topi Grm4$^{-\backslash-}$ sono stati analizzati in termini di fenotipo immunologico tramite citofluorimetria come percentuale di cellule CD4$^+$, CD8$^+$, γδ$^+$, B220$^+$, CD11b$^+$ e CD11c$^+$ nella milza, nei linfonodi totali e nei leucociti infiltranti il cervello. È stata effettuata anche una doppia immunoreattività per i linfociti T CD4$^+$ purificati da linfonodi totali con anticorpi anti CD25 e anti Foxp3. Non sono stati trovati differenze significative tra Grm4$^{-\backslash-}$ e i loro controlli se non una riduzione delle cellule CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ nei linfonodi totali.

3.2 Induzione dell'EAE e trattamento in vivo con PHCCC

L'immunizzazione attiva è stata indotta negli animali, WT e Grm4$^{-/-}$ tramite una iniezione sottocutanea a livello degli arti inferiori per animale di 200 µg di MOG (glicoproteina oligodentrocitaria della mielina) peptide 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) emulsionato in 0.1 ml di adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di Mycobacterium tubercolosis.

In seguito, gli animali sono stati trattati intraperitonealmente con 200 ng di tossina della pertosse in 100 µl di PBS (phosphate-buffered) al giorno dell'immunizzazione (0) e al due giorni dopo [42]. Gli animali di controllo hanno ricevuto adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di *Mycobacterium tubercolosis* (Difco) senza MOG_{35-55} e l'iniezione a giorno 0 e 2 dall'immunizzazione della tossina della pertosse. Gli animali sono stati monitorati giornalmente per osservare il decorso clinico della malattia per la durata di due mesi.

L'N-phenyl-7-(hydroximino)cyclopropa[*b*]chromen-la-carboxamide (PHCCC) fornito dalla Tocris Cookson Ltd, è stato sciolto in olio di semi ed è stato somministrato alla dose di 3 mg/kg tramite iniezione sottocutanea per 40 giorni in regime profilattico. Gli animali di controllo hanno ricevuto solo il veicolo. In un altro esperimento il farmaco è stato somministrato in regime terapeutico ai primi sintomi di malattia (giorno 14-17 per i WT e 11-13 per i Grm4$^{-/-}$). Per l'immunizzazione passiva, i topi sono stati sottoposti all'EAE e sono stati usati come donatori di linfociti T CD4^{+} patogenetici, che sono stati purificati dalla milza e dai linfonodi ed incubati per 48 ore con: anti-CD3ε (145-2C11; 1µg/ml) e anti-CD28 (PV-;1µg/ml) in presenza di MOG (25µg/ml). Una concentrazione di 20 x 10^{6} cellule CD4^{+} per topo sono state trasferite tramite iniezione sottocutanea in

topi WT riceventi, i quali 18 ore prima sono stati irradiati con una dose subletale di 450 rad. In un altro set di esperimenti con immunizzazione passiva le cellule T $CD4^+$ sono state depletate del subset di cellule T $CD25^+$ (Milteny Biotec). Gli animali sono stati monitorati nello stesso modo dell'immunizzazione attiva.

Il modello di EAE relapsing-remitting (RR-EAE) è stato indotto in topi SJL/J immunizzati con 75 µg di PLP frammento 139-151 (HSLGKWLGHPDKF) emulsionata in CFA contenente 6 mg/ml *di Mycobacterium tubercolosis* [43]. In seguito, gli animali sono stati trattati i.p. con 200 ng di tossina della pertosse in 100 µl di PBS al giorno dell'immunizzazione (0) e due giorni dopo. Dopo la prima relapse (12-15 giorni) i topi sono stati randomizzati in due gruppi per essere trattati con il PHCCC o con il veicolo.

3.3 Quantificazione della malattia e del grado di disabilità

La valutazione clinica è stata effettuata misurando giornalmente il peso corporeo di ciascun animale e i deficit neurologici sono stati monitorati misurando i seguenti criteri:

0 = nessun segno di malattia;

1 = coda flaccida;

2 = paraparesi moderata;

3 = paraparesi grave;

4 = tetraparesi (stato moribondo);

5 = morte.

3.4 Istologia ed immunoistochimica

Trenta giorni dopo l'immunizzazione con MOG, gli animali sono stati anestetizzati tramite somministrazione i.p di Avertin (125 mg/kg) e perfusi per via cardiaca con una soluzione al 4% di paraformaldeide in PBS. Il midollo spinale ed il cervello sono stati rimossi e fissati per 24 ore in una soluzione composta da alcol etilico (60%), acido acetico (10%) e cloroformio (30%); in seguito sono stati trasferiti in etanolo al 70% fino all'inclusione in paraffina. Sono state effettuate sezioni seriali di cervello e midollo spinale di 5µM per la colorazione con ematossilina-eosina per la valutazione istologica dell'infiltrato infiammatorio nel sistema nervoso centrale. Per l'analisi immunoistochimica le sezioni deparaffinate sono state impregnate di perossido di idrogeno al 3% per il blocco endogeno dell'attività della perossidasi e sono state incubate con anti-rabbit policlonale anti-MBP (Chemicon), anti-mouse monoclonale anti-MHCII (Chemicon), anti-rat monoclinale anti-CD4 e anti-rabbit policlonale anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology) seguiti da anticorpi appropriati biotinilati anti-rabbit anti-mouse e streptavidina-HRP (Zimed). L' immunoreattività per CD8 è stata valutata trattando le sezioni con tampone citrato (10mM, pH 6.0) e riscaldati al microonde per 10 minuti per rilevare l'antigene prima dell'incubazione con anticorpo anti-rabbit policlonale anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology). Per il rilevamento è stato usato 3,3-Diaminobenzidine tetrachloride (ABC Elite kit; Vector Laboratories). Per l'immunoistochimica in fluorescenza per CD4 le sezioni sono state incubate per 72 ore con l'anticorpo monoclonale anti-CD4 e successivamente con l'anticorpo anti-rat IGg coniugato con FOTC (Vector Laboratories). I controlli sono stati effettuati senza l'utilizzo di anticorpi primari.

3.5 Isolamento e stimolazione di leucociti

La purificazione delle cellule $CD4^+$, $CD4^+CD25^-$ e $CD4^+CD25^+$, dai linfonodi e delle cellule dendritiche (DCs) dalla milza sia nella porzione frazionata che non cDCs e pDCs è stata eseguita come descritto[44;45]

Per l'induzione delle citochine, le cellule $CD4^+$ ($1x10^6$/ml) sono state messe in coltura in presenza di 2×10^5 cellule T, irradiate depletate derivanti da campioni di cellule spleniche (cellule presentanti l'antigene, APCs) e 10μM del peptide MOG per 2 giorni. Per la differenziazione *in vitro,* sono state purificate le cellule T $CD4^+CD25^-$ e sono state attivate per 5 giorni su piastre coattate con anti-CD3 e anti CD-28 in presenza di diverse combinazioni di citochine ricombinanti: IFN-γ (5 ng ml^{-1}) e anti-IL-4 (11B11; 10 μg ml^{-1}) per la differenziazione delle cellule T_H1; IL-4 (10 ng ml^{-1}) e IFN-γ (XMG1.2; 10 μg ml^{-1}) per le cellule T_H2; TGF-β (5ng ml^{-1}), IL-6 (20 ng ml^{-1}), anti-IFN-γ (10 μg ml^{-1}) e anti-IL-4 (10 μg ml^{-1}) per le cellule T_H17 [46]; e TGF-β (10 μg ml^{-1}) per le cellule iT_{reg}.

Per il saggio di soppressione delle cellule T_{reg}, è stata allestita una cocoltura di cellule $CD4^+CD25^-$ in combinazione con cellule T spleniche deplete ed irradiate e cellule $CD4^+CD25^+$ per tre giorni in presenza di anti-CD3 solubile. La proliferazione è stata misurata tramite incorporazione di [^{3}H]Timidina in accordo con le procedure standard.

Le cellule DCs spleniche, sono state purificate tramite colonne magnetiche MicroBeads e MidiMacs (Miltenyi biotec) per CD11c in presenza di EDTA per rompere i complessi tra le cellule T-CDs [47]. Per la purificazione delle cellule dendritiche convenzionali (cDCs) e plasmocitoidi (pDCs), le cellule $CD11c^+$ sono

state frazionate usando rispettivamente colonne magnetiche MicroBeads per CD11b e mPDCA-1 [48].

La produzione di citochine, dalla frazione totale o dalle sottopopolazioni delle cellule DC, è stata misurata nel sovranatante delle colture raccolto dopo l'incubazione delle cellule per 24 ore con il mezzo da solo, con lipopolisaccaride (LPS) 1 $\mu g\ ml^{-1}$ per le cellule cDCs, o 10 $\mu g\ ml^{-1}$ CpG-ODN 1826 5' TCCATGACGTTCCTGACGTT-3' (costrutto fosforotiato Invitrogen Life Technologies) per le cellule pDCs.

L'isolamento dei leucociti infiltranti il cervello (BILs), è stato eseguito come descritto da [49; 50]; in breve il cervello è stato prelevato da animali anestetizzati e perfusi con PBS freddo. Dopo la centrifugazione dell'omogenato cerebrale, i leucociti infiltranti sono stati separati su gradiente discontinuo di percoll (Sigma). La produzione di citochine dai BILs è stata misurata nel sovranatante recuperato dopo l'incubazione per 24 ore con il mezzo da solo. L'espressione di *Tbx21, Gata3, Rorc, e Foxp3* è stata valutata dalle cellule $CD4^+$ derivanti da BILs e LN.

Le coculture di cellule T-DC, cellule T 5×10^5 $CD4^+CD25^-$ sono state incubate con 1.6×10^5 cellule DCs non-frazionate (rapporto 3:1) per 48-72 ore in presenza 2.5 μg/ml di anti-CD3 solubile come descritto (40supp).

Per il trattamento delle cellule *in vitro*, il PHCCC è stato sciolto in DMSO ed utilizzato ad una concentrazione 40 µM; KT5720 (Sigma-Aldrich) usato ad una concentrazione finale di 300 nM; 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (Sigma-Aldrich) usato ad una concentrazione finale di 100 μM;

3.6 Citoflurimetria

In tutte le analisi al FACS le cellule sono state trattate con rat anti-CD16/32 (2.4G2) per 30 minuti a 4°C per bloccare il recettore Fc prima dell'esperimento con il citofluorimetro EPICS usando un software EXPO 32 ADC (Beckman Coulter). Per la determinazione delle cellule Foxp3 positive, le cellule sono state marcate con anti-CD4(GK1.5)-PE (BD Pharmingen), fissate, permeabilizzate e marcate con Alexa Fluor 488 anti-mouse Foxp3 (MF-14; Biolegend) o l'isotopo di controllo Alexa Fluor 488 rat IgG2b [51] inoltre sono stati usati anticorpi FITC anti-mouse CD45R/B220 (clone RA3-6B2, BD Pharmingen), anti-mouse CD11c (clone N418 eBioscience) e anti mouse CD11b (clone M1/70). Nelle coculture di cellule T-CD l'espressione intracellulare di IL-17A e IFN-γ è stata valutata su cellule $CD4^+$ dopo l'uso di una soluzione Fissante/Permeabilizzante.

3.7 rRT-PCR, sintesi di siRNA e transfezione

L'analisi in PCR Real-time per: *Tbx21, Gata3, foxp3, Grm4, Grm6, Grm7, Grm8 e Gadph* è stata eseguita come descritto [52], usando primers elencati nella tabella 1.

Come controllo positivo dell'espressione dei recettori mGlu è stato usato omogeneizzato di cervello non frazionato. Per il silenziamento dell'mRNA per *Grm4*, il siRNA ON-TARGET*plus* è stato predisegnato in base alla sequenza del gene ID 268934 e sintetizzato dalla Thermo Scientific (Dharmacon RNAi Technologies). Non-Targeting siRNAs è stato usato come controllo negativo. Gli esperimenti di transfezione sono stati condotti come descritto da Grohmann 2007.

3.8 Analisi Western Blot e determinazione di citochine

L'espressione del recettore mGlu4 è stata esaminata tramite immunoblotting su lisato intero derivante da cellule T $CD4^+CD25^+$ dopo stimolazione con anti-Cd3, anti-CD28, o dopo stimolazione da parte delle cellule DCs. L'analisi Western blot è stata condotta come descritto da [53] con l'uso di un anticorpo policlonale specifico per la sequenza C-terminale per mGluR4 [54].

Le citochine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-22 IL-23, IL-27, IFN-γ, TNF-α e TGF-β) sono state misurate tramite specifici kit ELISA (R&D Systems and Abnova Corporation) sul sovranatante delle culture.

3.9 Determinazione dei livelli intracellulari di cAMP e extracellulari di glutammato

La misurazione dei livelli di cAMP è stata effettuata sulla porzione non frazionata di cellule DCs (1.3×10^6 cellule/300μl/campione) pre-incubate per 20 minuti con una soluzione Locke (senza-glutammato) pH 7.4, contenente 0,5 isobutilmetilxantina (inibitore delle fosfodiesterasi) per abbassare i livelli di cAMP.

Trenta secondi prima dell'aggiunta di 10 μM di forskolin (FSK; Sigma-Aldrich) o di LPS 1μg ml^{-1} le culture sono state trattate con PHCCC (sciolto in DMSO ad una concentrazione iniziale di 20 mM e diluita in Locke ad una concentrazione finale di 2,5, 10 o 40 μM) o con L-(+)-2-amino-4-phosphonobutanoate (L-AP4, 5 μM; Tocris

Cookson Ltd). La reazione è stata stoppata con l'aggiunta di un ugual volume di 0,8 N $HClO_4$; in seguito sono stati prelevati 180 μl di sovranatante ai quali sono stati aggiunti 20 μl di K_2CO_3 (2M) e dopo la centrifugazione sono stati prelevati 20 μl di campione usato per il saggio del cAMP.

I livelli di cAMP sono stati misurati tramite Cyclic AMP [^{3}H] Biotrak Assay System (Amersham Biosciences). Gli stessi campioni sono stati usati per la misurazione extracellulare di glutammato in HPLC come descritto da [55].

3.10 Analisi Statistica

I dati dell'EAE sono stati analizzati con il test U non parametrico di Mann-Whitney. Per comparare la media dei giorni della comparsa dei sintomi e del punteggio massimo di disabilità è stato usato il Mann-Whitney's rank sum [56].

Per l'analisi della regressione lineare di ogni curva di disabilità dell'EAE indotta da MOG è stata usata la media dell'andamento clinico come variabile dipendente e i giorni come variabile indipendente.

Tutte le determinazioni *in vitro* risultano dalla media ± la deviazione standard derivante da tre esperimenti indipendenti. Tutti i valori di *n* sono stati elaborati tramite l'analisi di potenza per avere una potenza almeno dell'80% con un livello α di 0.05.

RISULTATI

4.1 La mancanza del recettore mglur4 peggiora l'andamento dell' EAE

Topi knockout per il recettore mGlu4 ($Grm4^{-/-}$) e topi wild-type (WT) sono stati immunizzati con la proteina oligodendrocitica della mielina (MOG) frammento 35-55, e l'andamento della malattia è stato monitorato giornalmente per un periodo di 40 giorni.

L'assenza del recettore mGlu4 risulta associata ad una precoce ($P < 0,005$) e più severa ($P < 0,05$) comparsa dei sintomi e con un aumento della mortalità superiore al 40% (fig. 1; Tab. 2). Gli animali Grm4-/- immunizzati inoltre, hanno mostrato un aumento della demielinizzazione e dell'infiltrato infiammatorio nella sostanza bianca e nel midollo spinale rispetto ai topi di controllo (fig. 2). Nonostante il modello di EAE sia caratterizzato dalla migrazione delle cellule $CD4^+$, $CD8^+$ e $B220^+$ dai linfonodi periferici al sistema nervoso centrale, la percentuale di cellule infiltranti $CD4^+$, $CD8^+$, cosi come $CD11b^+$ e $CD11c^+$ risultava significativamente più alta nel SNC dei topi $Grm4^{-/-}$ al picco della malattia (Tab.3; Fig 3) rispetto ai WT.

4.2 Il profilo d'espressione delle citochine nell'EAE è influenzata dalla segnalazione del recettore mGlu4

La valutazione dell'espressione delle citochine è stata valuta sia nei topi $Grm4^{-/-}$ che nei WT dopo l'immunizzazione con il MOG al picco dei segni neurologici (30 giorni dopo l'immunizzazione). L'analisi delle cellule T $CD4^+$, derivanti dai leucociti infiltranti il

cervello (BILs) negli animali Grm4$^{-/-}$ rispetto ai relativi controlli, ha mostrato un significativo aumento del fattore di trascrizione *Rorc* (che codifica fattori specifici per le cellule T_H17), nessun cambiamento nell'espressione del fattore *Tbx21*(che codifica per Tbet; T_H1) e una riduzione nel fattore di trascrizione *Foxp3* (T_{reg}) (Fig.4).Lo stesso profilo di espressione risulta già nei primi stadi della malattia (10 giorni) nelle cellule T CD4$^+$ estratti dai linfonodi di animali deficitarii del recettore mGlu4. ((Fig.4). Nessuna differenza è stata rilevata nell'espressione del fattore *Gata3* (T_H2).

Il profilo di espressione delle citochine ha mostrato alti livelli di IL-17A e bassi di TGF-β nelle cellule T e alti livelli di IL-6 e bassi di IL-27 nelle cellule DCs, suggerendo che l'assenza del recettore mGlu4 in presenza di (auto)antigeni sia in grado di spostare il programma di trascrizione verso geni infiammatori favorendo così le cellule T_H17 rispetto alle cellule T_{reg}.

4.3 Espressione di Grm4 nelle cellule del sistema immunitario

È stata valutata l'espressione di *Grm4, Grm6, Grm7,* e *Grm8* tramite rRT-PCR (real-time polymerase chain reaction) nelle colture di leucociti infiltranti il sistema nervoso centrale, linfonodi periferici e splenociti nei WT (Fig. 5a). Nessun trascritto è stato ritrovato per *Grm6* sia nelle diverse sottopopolazioni linfocitarie, che nel tessuto cerebrale, mentre l'espressione di *Grm4, Grm7* e *Grm8* ha mostrato caratteristiche di localizzazione cellulare distinte. In particolare, *Grm4* risulta maggiormente espresso nelle cellule TCD4$^+$, CD11c$^+$ stabilendo cosi quali cellule siano un potenziale bersaglio per gli effetti mediati dal recettore mGlu4. L'attivazione delle cellule CD4$^+$CD25$^-$ in condizioni che favoriscono l'induzione di cellule T_{reg}, porta ad una sovraregolazione di

Grm4, cosa che non accade in un ambiente che favorisce l'orientamento delle cellule T_H2. I maggiori livelli di espressione di *Grm4* sono associati anche alle cellule nTreg attivate mentre, risulta virtualmente assente in linfociti T_H17 differenziati. (Fig. 5b).

La presenza del gene *Grm4*, è stata verificata anche nelle cellule DC sia nelle cellule dendritiche convenzionali (cDCs, $CD11b^+CD11c^{high}$), che plasmacitoidi (pDCs; $mPDCA\text{-}1^+CD11c^{low}$) estratte dalle milze di animali WT. L'espressione di *Grm4* è stata trovata sia nelle cellule cDCs che nelle pDC e la sua espressione aumenta in ambienti che mimano l'infezione batterica tramite l'attivazione del recettore Toll-like come la stimolazione con lipopolisaccaride (LPS) per le cellule cDCs e CpG-oligonucleotidi (CpG-ODN) per le pDCs (Fig. 5c). La modulazione dell'espressione del recettore mGlu4 nelle cellule nT_{reg} e nelle cellule cDCs è stata confermata dai livelli proteici (Fig. 5d), supportando l'ipotesi che l'attivazione del recettore mGlu4 all'interno della sinapsi immunologia contribuisca al dialogo e al condizionamento reciproco tra cellule T e cellule accessorie.

4.4 Il recettore mGlu4 è richiesto dalle cellule DCs per dirigere la differenziazione delle cellule T Helper

È stata esaminata ogni possibile funzione regolatoria del recettore mGlu4 nell'interazione tra le cellule T $CD4^+$ e DCs usando culture di cellule singole ed in combinazione.

Non sono state trovate differenze significative nella produzione di citochine e nella proliferazione cellulare tra le culture di cellule T $CD4^+CD25^-$ $mGluR4^+$ e $mGluR4^-$(Fig. 6). Al contrario, le cellule pDCs e cDCs derivanti da topi *Grm4*$^{-/-}$ in risposta a LPS o CpG-ODN rispettivamente, producono alti livelli di IL-6 e IL-23 e bassi di IL-12 e IL-

27 rispetto ai controlli WT (Fig 7a). Nessun cambiamento fenotipico è stato osservato nelle cellule DCs mature ed immature derivanti dai due genotipi diversi.

Le coculture di cellule T $CD4^+$-DC hanno mostrato che l'uso di cDCs, derivanti da animali $Grm4^{-/-}$ in cultura con cellule T normali, porta ad un aumento della percentuale delle cellule T IL-17^+CD4^+ ($P < 0,001$), mentre la porzione di cellule T INF-γ^+CD4^+ risulta significativamente ridotta ($P < 0,0001$) (Fig 7b, c). In linea con questi dati abbiamo osservato nessun effetto adattativo quando le coculture sono formate da cellule DCs e T derivanti da topi *Grm4*$^{-/-}$.

Questi dati lasciano presupporre che gli effetti dell'assenza del recettore mGlu4 siano dipendenti dalle cellule DCs. La misurazione della concentrazione di citochine nel sovranatante delle culture mostra una diminuita quantità di IL-2 associata alle cellule T_H1 nelle coculture con cDCs *Grm4*$^{-/-}$. (Fig 7d).

Visto che l' IL-27 è in grado di controbattere l'effetto dell'IL-6 nel promuovere lo sviluppo delle cellule T_H17 [57], effetto capace di limitare lo sviluppo dell'EAE, la diminuzione dell'IL-27 durante l'attivazione delle cellule T $CD4^+$ potrebbe favorire lo sviluppo delle cellule T_H17.

4.5 Il recettore mGluR4 modula i livelli di cAMP nelle cellule Dendritiche

Le vie di segnalazione che portano ad un aumento della formazione di cAMP nelle cellule DCs (come dopo stimolazione con LPS [58; 59], causano una diminuzione delle citochine associate ad una risposta T_H1 (IL-12; IL-27) e ad un aumento delle citochine associate alle T_H17 (IL-6; IL-23).Nei terminali nervosi presinaptici e nella microglia,

l'attivazione dei recettori mGluR4 porta ad un abbassamento dei livelli di cAMP intracellulari in maniera proteina G_i dipendente [60].

Il trattamento delle cellule DCs derivanti da animali WT con forskolin o con LPS, entrambe in grado di stimolare l'adenilato ciclasi, in presenza di L-AP4 o PHCCC, ha mostrato una forte riduzione nell'aumento dei livelli intracellulari di cAMP nelle DCs indotto da forskolin o LPS (Fig 8a).

Il PHCCC è risultato in oltre capace di aumentare la produzione di IL-12, IL-27 e TGF-β e di diminuire la produzione di IL-6, IL-10 e IL-23 nelle cellule DCs stimolate con LPS (Fig 8a).

Un simile profilo di espressione è stato riprodotto usando cellule DCs *Grm4*$^{-/-}$ in combinazione con KT 5720, un inibitore specifico della proteina chinasi A (PKA) (Fig 8b). In contrasto il PHCCC non ha effetto sul rilascio di citochine nelle cellule DCs *Grm4*$^{-/-}$.

4.6 L'attivazione del recettore mGluR4 contribuisce alla resistenza allo sviluppo dell'EAE in vivo

La ripetuta somministrazione *in vivo* di PHCCC partendo dal primo giorno dall'immunizzazione (Fig. 9), ma non dopo la comparsa dei sintomi (Fig. 10), attenua significativamente la malattia nei WT ma non nei Grm4$^{-/-}$($P < 0{,}005$; Fig 9; Fig. 11) Sebbene non siano stati trovati cambiamenti significativi nella popolazione delle cellule immunitarie infiltranti il cervello BILs dopo il trattamento con il PHCCC, è stato riscontrato un sostanziale aumento nella porzione delle cellule T $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+Foxp3^+$ nei linfonodi.

L'effetto protettivo del PHCCC nei topi WT è associato ad una risposta immunitaria dominata e diretta dalle cellule T $Foxp3^{+}CD4^{+}$ e T_H1 e da una riduzione dell'immunità mediata dalle cellule T_H17.

L'effetto protettivo delle T_{reg} è stato confermato nell'esperimento di immunizzazione passiva, dove le cellule $CD4^{+}$ derivanti da animali WT trattati con PHCCC, risultano in grado di trasferire la malattia solo quando le cellule $CD25^{+}$ sono deplete. (Fig 6e).

Nonostante gli effetti del PHCCC siano lievi, ma significativi (P=0,002) nel trattamento farmacologico in terapia (Fig 12), questi dati suggeriscono che l'uso di un modulatore allosterico del recottere mGluR4 sia capace di supportare lo sviluppo delle cellule T_{reg} la cui azione regolatoria può incidere sulle cellule T_H17.

Nel modello di EAE relapse-remitting (RR-EAE) l'uso del PHCCC risulta in grado di ridurre il numero e la severità delle recidive quando somministrato nel corso della prima ricaduta. (Tab.4).

Questi dati forniscono la prima evidenza sperimentale che il glutammato agisca da interfaccia tra il sistema immunitario e nervoso e che la sua attivazione sulle cellule DCs sia in grado di modulare l'espressione delle citochine.

5.1 CONCLUSIONE

La sclerosi multipla è una malattia cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) immuno-mediata. Le caratteristiche cliniche ed istopatologiche suggeriscono un eziologia infiammatoria che coinvolge cellule dell'immunità innata residenti nel SNC così come le cellule dell'immunità adattativa. Cellule T encefalitogeniche reattive contro la mielina, risultano coinvolte nell'iniziazione della cascata infiammatoria causando demielinizzazione e danno assonale. Le cellule dendritiche possono avere un ruolo strategico nella modulazione della cascata immunopatologica che è alla base dell'EAE.

Nel modello di EAE è stato visto che le cellule DCs, associate al microcircolo risultano essenziali per il riconoscimento locale dell'antigene da parte delle cellule T reattive alla mielina, inoltre le cellule DCs modulano l'equilibrio del ricircolo delle cellule Treg encefalitogeniche nel SNC. Questa capacità è influenzata dalle molecole co-stimolatorie o co-inibitorie espresse sulla membrana delle cellule DCs. Il fatto che, le cellule DCs si accumulino nel SNC prima delle cellule T suggerisce che siano in grado di determinare l'esito della risposta immune contro il SNC [61].

Sebbene la comunicazione sinaptica e la plasticità sinaptica richieda glutammato, un eccessivo suo rilascio e segnalazione tramite iGluRs può causare eccitotossicità, morte neuronale e perdita di oligodendrociti in grado di produrre mielina [62; 63].

Sono state descritte alterazioni sinaptiche, durante il decorso di malattie autoimmuni mediate da citochine infiammatorie rilasciate da cellule T infiltranti e dalla microglia attivata, che risultano responsabili della patologia irreversibile dei dendriti [64]. Nel cervello di pazienti con sclerosi multipla sono stati trovati alti livelli di glutammato [65; 66] e per questo insieme alle citochine infiammatorie solubili, il glutammato è stato

proposto come uno dei maggior determinanti di neurodegenerazione nella sclerosi multipla cosi come nel modello di EAE.

Come altri neurotrasmettitori il glutammato, a causa della diversa natura e funzione dei recettori su cui agisce, potrebbe influenzare la neuroinfiammazione tramite effetti specifici sulle cellule del sistema immunitario [65; 66]. In questo studio si è visto che, topi che non esprimono il recettore mGlu4 sono più vulnerabili all'EAE, sviluppando un' esacerbata risposta neuroinfiammatoria dominata dalla produzione di IL-17 da parte delle cellule T_H17. Il trattamento dei topi WT, con un modulatore allosterico positivo per il recettore mGlu4 è in grado di indurre una risposta protettiva mediata dalle cellule $CD4^+$ T_{reg}.

Il recettore mGlu4 risulta costitutivamente espresso in tutte le cellule DCs periferiche e in specifiche cellule $CD4^+$ incluse le cellule T_{reg}, ma non le cellule T_H17. In particolare, l'assenza del recettore mGlu4 nelle cellule DC, più che nelle cellule $CD4^+$ è in grado di spingere la differenziazione verso il fenotipo T_H17. Questi dati mostrano che, il glutammato esercita effetti immunoregolatori tramite la sua azione sulle cellule DCs influenzando lo sviluppo delle cellule T_H. Nel nostro modello l'attivazione del recettore mGlu4 risulta in grado di modulare la concentrazione di cAMP e la risposta all'infiammazione tramite citochine e inibizione dello sviluppo delle cellule T_H17.

Durante l'infiammazione la concentrazione di glutammato plasmatico aumenta a livelli che può saturare il recettore mGlu4 (>40 μM) [67; 68] in queste condizioni l'attivazione endogena del recettore mGlu4 può essere rinforzata dal PHCCC.

L'uso di modulatori allosterici positivi per il recettore mGlu4 può aprire la strada a nuove terapie innovative atte a ristabilire il giusto equilibrio nelle cellule T_H nella neuroinfiammazione.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1:Sequenze oligonucleotidiche senso e antisenso per rRT-PCR

Tbx21	S, 5'-GGACGATCATCTGGGTCACATTGT AS, 5'-GCCAGGGAACCGCTTATATG-3'
Gata3	S, 5'-TCTGGAGGAGGAACGCTAATG-3' AS, 5'-GGCTGGAGTGGCTGAAGG-3'
Rorc	S, 5'-AGCAGTGTAATGTGGCCTAC-3' AS, 5'-GCACTTCTGCATGTAGACTG-3'
Foxp3	S, 5'-AGAGCCCTCACAACCAGCTA-3' AS, 5'-CCAGATGTTGTGGGTGAGTG-3'
Grm4	S, 5'-GGCCCTCAAGTGGAACTATG-3' AS, 5'-CTCGTTGGCAAAGATGATGA-3'
Grm6	S, 5'-AAGTGATCCGGAGGCTCAT-3' AS, 5'-AGGAAGTGGCCAGTCAGGT-3'
Grm7	S, 5'-CCTGGTTATCGTCTCATTGG-3' AS, 5'-CACACAGAGGGTGGGATCT-3'
Grm8	S, 5'-CCACCCATATTCACCAAGC-3' AS, 5'-CTGGGGCTGTAGATGCATAG-3'
Gapdh	S, 5'-GCCTTCCGTGTTCCTACCC-3' AS, 5'-CAGTGGGCCCTCAGATGC-3'

Tabella 2:EAE in topi WT and *Grm4*$^{-/-}$.

Exp No.	Animali	(*n*)	Incidenza (%)	Mortalità (%)	Comparsa dei sintomi (media ± s.d)	Score massimo (media ± s.d.)
1	WT	7	100	14,26	15,9 ± 2,1	3,1 ± 0,9
1	*Grm4*$^{-/-}$	9	100	55,5	11,5 ± 1,0	4,3 ± 0,8
				P=0,182	P=0,004	P=0,038
2	WT	11	90,9	18,18	16,8 ± 3,4	3,2 ± 1,1
2	*Grm4-/-*	9	100	55,6	12,2 ± 1,6	4,3 ± 0,9
				P=0,168	P<0,001	P=0,037
3	WT	8	100	12,5	14,2 ± 1,5	3,0 ± 0,9
3	*Grm4*$^{-/-}$	7	100	42,8	11,4 ± 1,1	4,1 ± 0,8
				P=0,336	P<0,001	P=0,040

L'EAE è stata indotta in topi WT e Grm4–/– tramite immunizzazione attiva con il peptide MOG Solo gli animali che hanno sviluppato la malattia sono stati inclusi nell'analisi

Tabella 3: Analisi quantitativa delle popolazioni di cellule totali estratte da milza, linfonodi (LNS) e dei leucociti infiltranti il cervello-(BILs) in topi WT e Grm4-/- i topi in condizioni basali o al 30 d dopo vaccinazione con MOG.

	Milza				Linfonodi				BILs			
Ceppo	WT		*Grm4*$^{-/-}$		WT		*Grm4*$^{-/-}$		WT		*Grm4*$^{-/-}$	
MOG	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Fenotipo cellulare												
% totale di cellule												
CD4$^+$	20.9[a]	4.3*	22.7	3.2*	34.9	26.5†	44.1§	26.8*	nd	2.9	nd	9.6§
CD8$^+$	10.3	3.4†	11.5	2.2†	17.0	4.4*	16.8	5.4*	nd	2.3	nd	6.8§
γδ$^+$	0.7	3.5†	0.5	2.4†	4.8	1.5†	5.8	1.2†	nd	0.3	nd	0.5
B220$^+$	44.0	5.6*	45.7	3.3*	38.9	43.2	33.9	32.9§	nd	7.5	nd	10.1
CD11b$^+$	10.0	8.9	10.5	4.8†	nd	nd	nd	nd	nd	4.6	nd	6.5§
CD11c$^+$	8.0	7.8	8.9	6.0†	7.4	7.8	8.9	7.0	nd	2.9	nd	7.9§
% di cellule CD4$^+$												
CD25$^+$	7.3	7.9	7.7	8.2	8.0	2.3†	8.4	1.7†	nd	nd	nd	nd
Foxp3$^+$	2.8	3.0	2.7	2.8	3.0	2.7	3.6	4.1	nd	nd	nd	nd

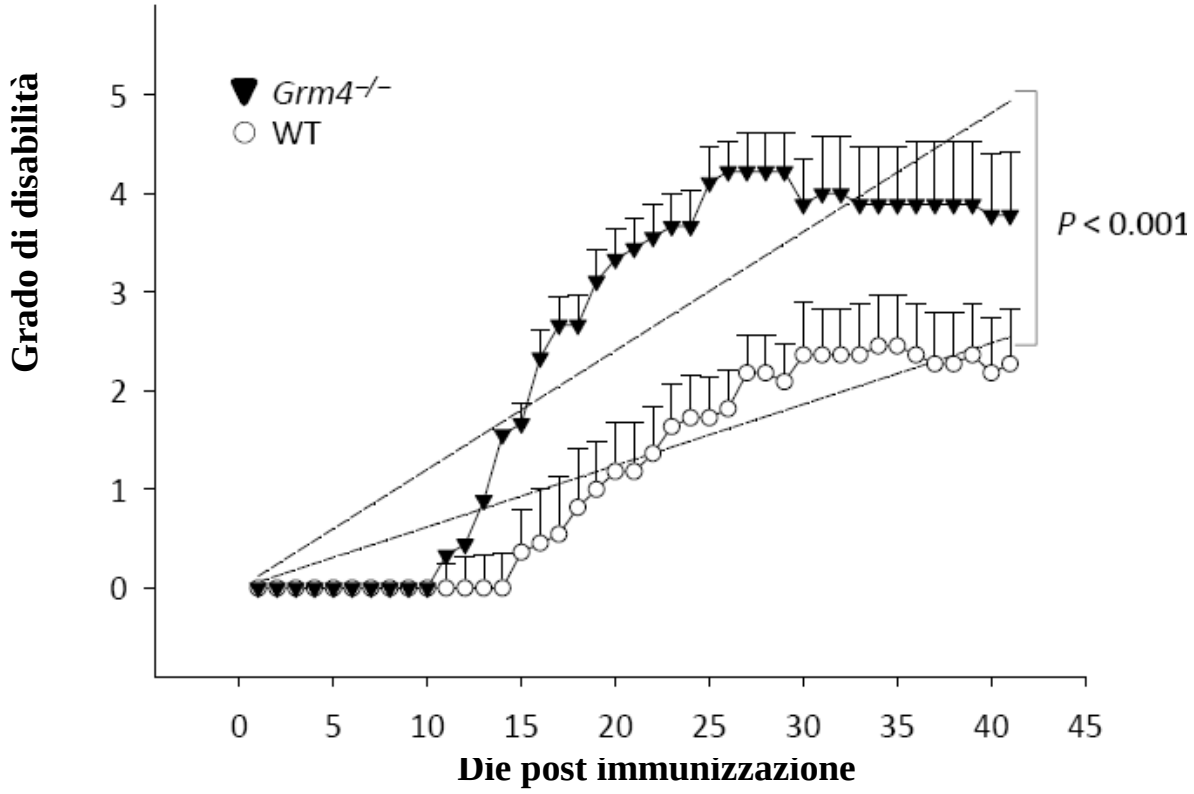
I dati sono espressi come media percentuale di cellule positive derivanti da tre esperimenti, ciascuno composto da tre topi per gruppo. s.d. (Non inclusi nella tabella) non ha mai superato il 15% del valore medio. * P <0.01 (EAE vs controllo); † P <0.05 (EAE vs controllo); § P <0.05 (Grm4-/ - topi WT).

Tabella 4: **Effetto del PHCCC sul modello EAE relapsing-remitting (RR-EAE).**

An.	Trattamento	Incidenza (%)	Mortalità (%)	Comparsa dei sintomi (media ± s.d)	Score massimo (media ± s.d)	Score cumulativo della malattia	Prima relapse	Seconda relapse
SJL	Veicolo	100	0	13,7 ± 1,1	2,9 ± 0,3	51,7 ± 7,7	20 ± 12,2	23,8 ± 4,9
SJL	PHCCC	100	0	13,3 ± 0,9	2,6 ± 1,5	35,9 ± 6,4	15 ± 7,1	13 ± 5,3
				P = 0,459	P = 0,192	P = < 0,001	P = 0,878	P < 0,001

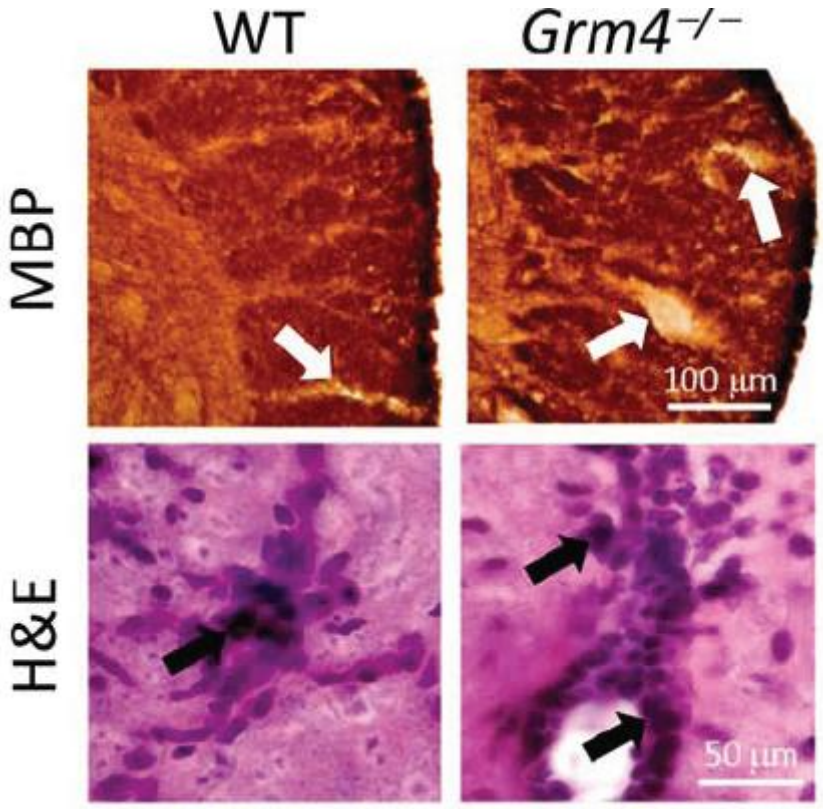
RR-EAE è stata indotta in SJL / j mice tramite immunizzazione con il peptide PLP.
Il PHCCC è stato somministrato quotidianamente s.c. alla dose di 3 mg kg^{-1} a partire dalla comparsa dei sintomi. I topi di controllo hanno ricevuto il veicolo (olio di sesamo).

Figura 1:Topi *Grm4*$^{-/-}$ sono altamente sensibili al EAE.



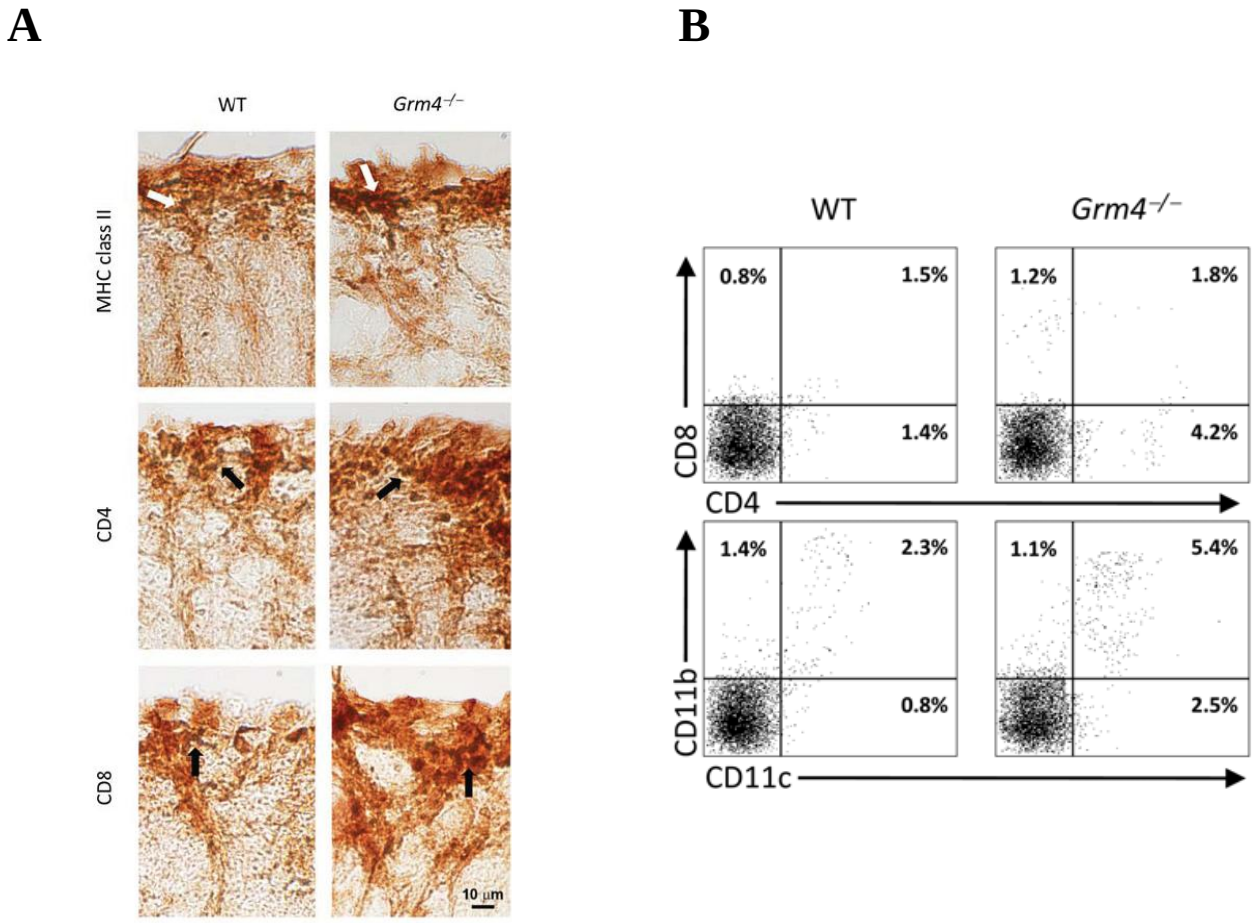
L'immunizzazione attiva con il peptide MOG è stata indotta nei topi WT e *Grm4*$^{-/-}$. Andamento clinico dell' EAE (media ±s.d.) nel tempo e analisi di regressione lineare.

Figura 2:Topi *Grm4*$^{-/-}$ sono altamente sensibili al EAE.



Analisi istopatologica di sezioni di midollo spinale da topi WT e *Grm4*$^{-/-}$ al 30 d.dopo l'immunizzazione. Le sezioni del midollo spinale sono state colorate con H & E per valutare l' infiammazione e marcate per la proteina basica della mielina (MBP) per valutare le aree di demielinizzazione. Le frecce indicano le aree demielinizzazione e la presenza di infiltrati cellulari infiammatori.

Figura 3: La mancanza del recettore mGlu4 aumenta l'invasione nel SNC da parte delle cellule CD4^{+}, CD8 $^{+}$e MHC di classe II + cellule nei topi sottoposti a EAE.



A. Sezioni di midollo spinale di topi immunizzati WT e Grm4$^{-/-}$ a 30 d. marcati con anticorpi anti-CD4, CD8 e anti-MHC di classe II. Le frecce indicanole Rappresentante cellule positive.
B. Elevata espressione di cellule infiltranti il CNS di CD4+, CD8+, CD11b+ e CD11c+ in topi *Grm4*$^{-/-}$ con EAE. I leucociti infiltranti il cervello sono stati purificati da topi WT e *Grm4*$^{-/-}$ a 30 giorni post-vaccinazione con MOG. I numeri mostrano la percentuale di cellule positive all'analisi.

Figura 4: La mancanza del recettore mGlu4 altera il differenziamento di cellule T_H e la produzione di citochine

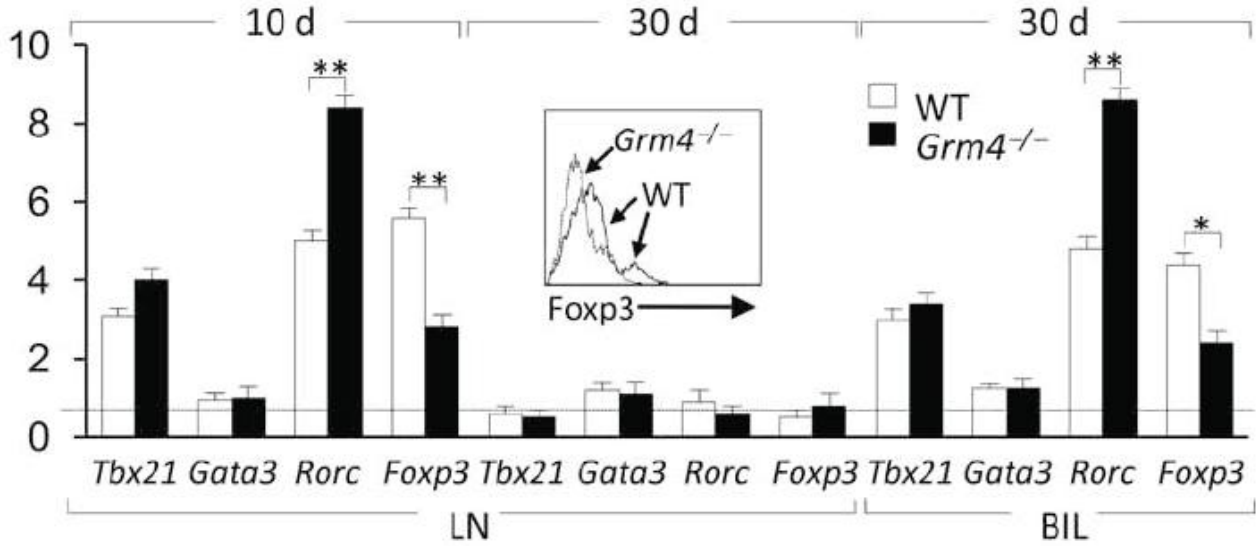
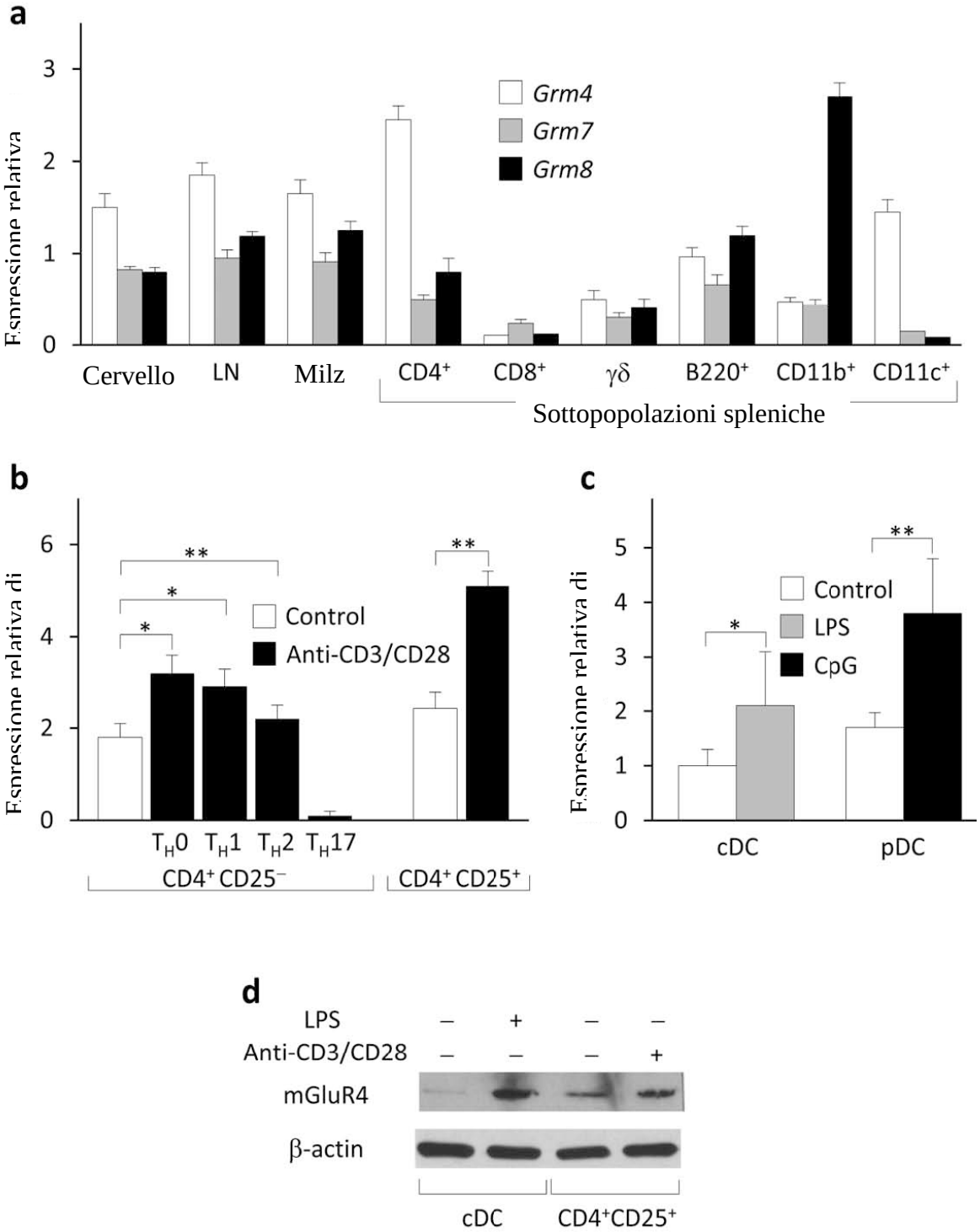
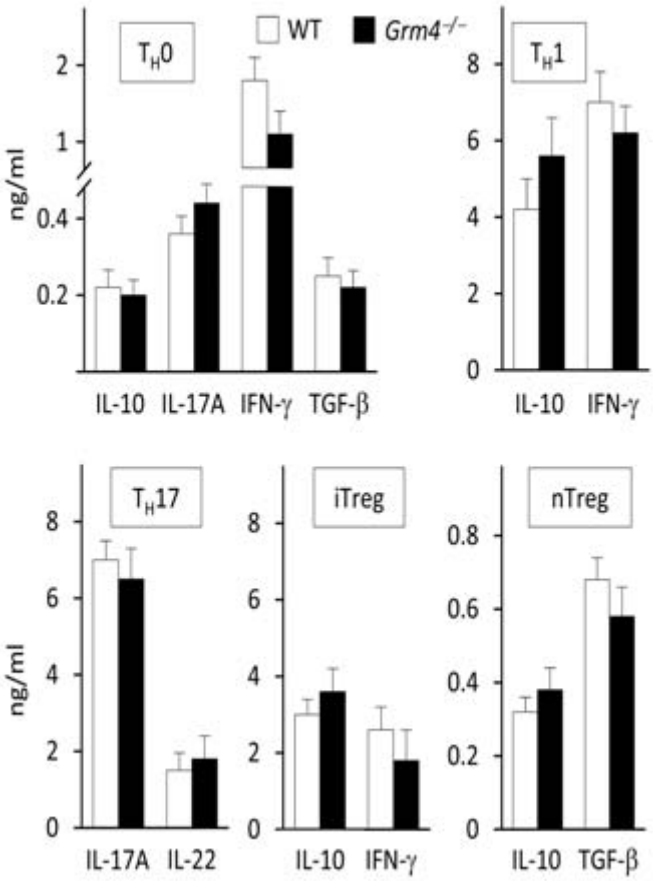


Figura 5:Cellule T CD4 $^{+}$ e DC esprimono alti livelli di mGluR4.



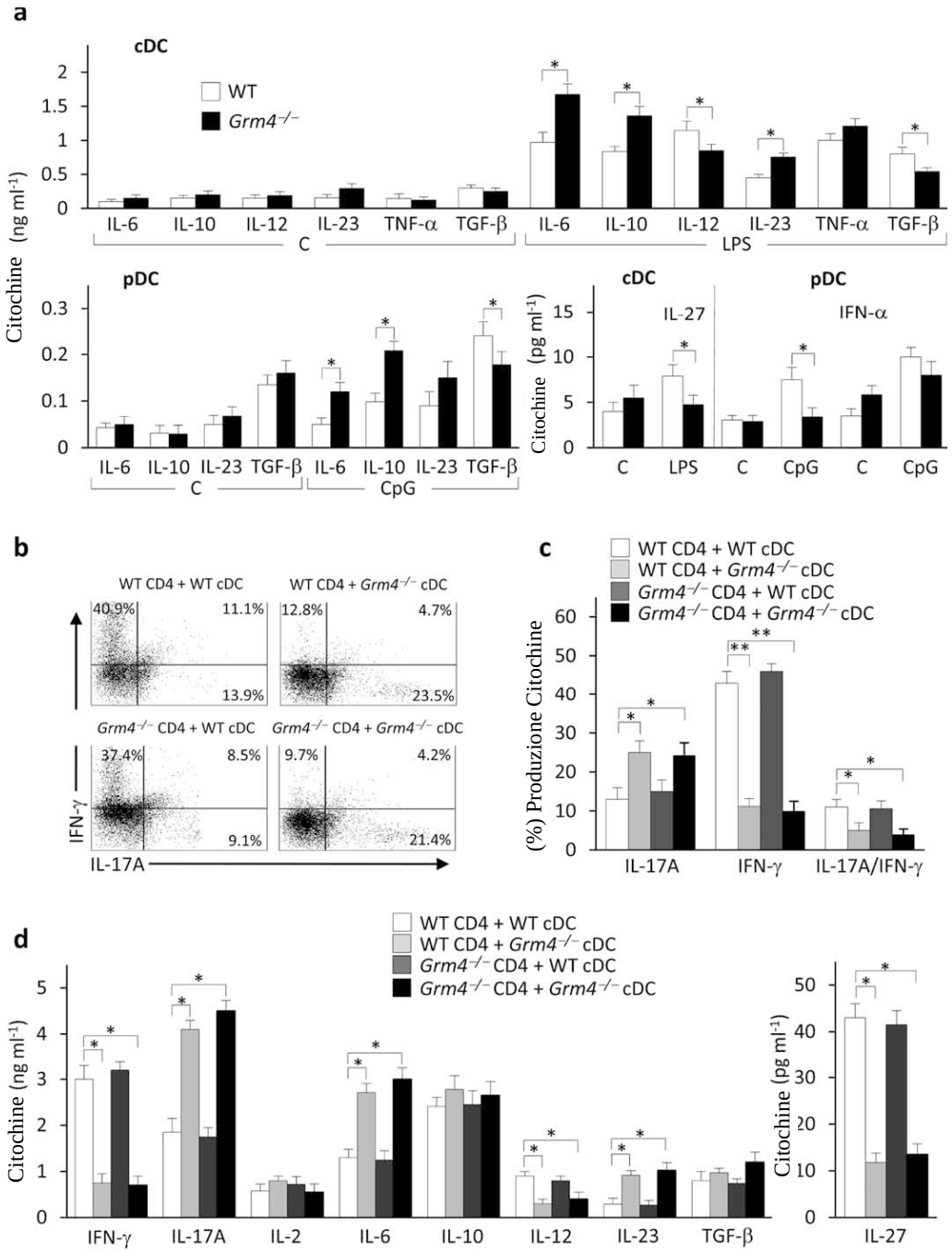
a analisi rRT-PCR per Grm4, Grm7 Grm8 nel cervello, nei linfonodi(LN), nella milza e in cellule CD4+, CD8+, γδ+, B220+, CD11b+ e CD11c + purificate. **b** analisi rRT-PCR per Grm4 in cellule T CD4+ CD25+ (nTreg) e CD4+CD25- in condizioni basali o dopo 48 ore di incubazione con anticorpi anti CD3 e CD28. L' attivazione delle cellule CD4+CD25- è stata effettuata in condizioni neutrali (TH0) o in presenza delle citochine ricombinanti appropriate per la differenziazione in T_H1, T_H2 o T_H17 cellule. **c** analisi rRT-PCR per *Grm4* in cDC e pDC isolate dalla milza e messe in cultura con il mezzo da solo (controllo) o in presenza di LPS o CpG-ODN, rispettivamente. **d** espressione proteica del recettore mGlu4 analizzata mediante analisi immunoblot dei lisati di cellule nTreg attivate con Anti-CD3/CD28 e stimolate con LPS..

Figura 6: Cellule T CD4 $^{+}$ derivate da topi Grm4$^{-/-}$ hanno un normale profilo citochinico



Cellule T naïve CD4^{+} CD25^{-} purificate da linfonodi di animali WT e Grm4-/ - attivate con anti-CD3 e anti-CD28 in assenza (T_H0) o in presenza di diverse citochine ricombinanti e/o miscele di anticorpi neutralizzanti specifici per T_H1, T_H2,T_H17, o inducibile Treg (iTreg).
Le cellule Treg naturali (nTreg) sono state analizzate dopo attivazione con anti-CD3 e anti-CD28. Nessuna significativa differenza nella produzione di citochine è stata trovata tra i due gruppi nelle diverse condizioni.

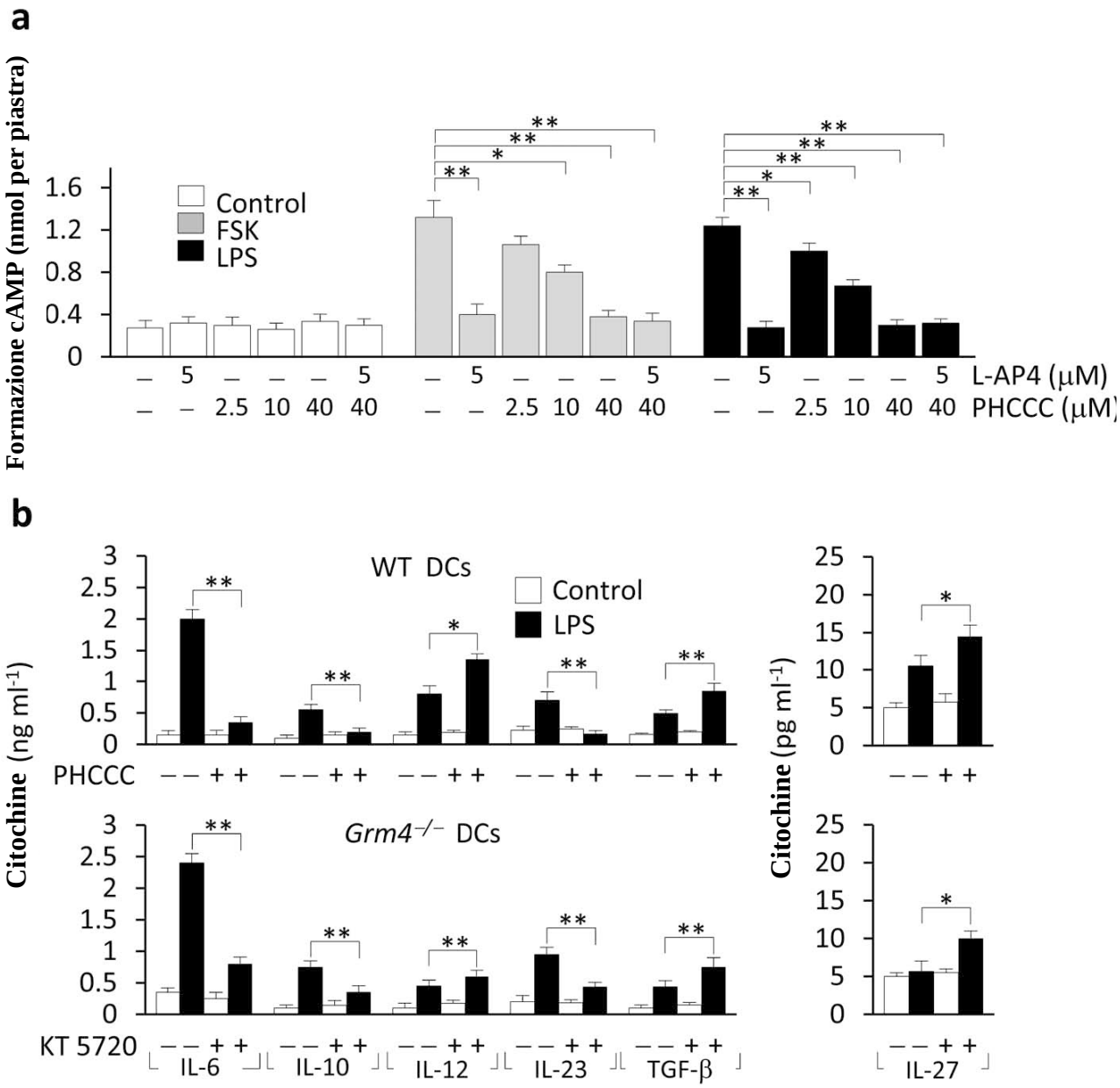
Figura 7: L'assenza del recettore mGlu4 nelle cellule DCs favorisce la comparsa di cellule TH17



.

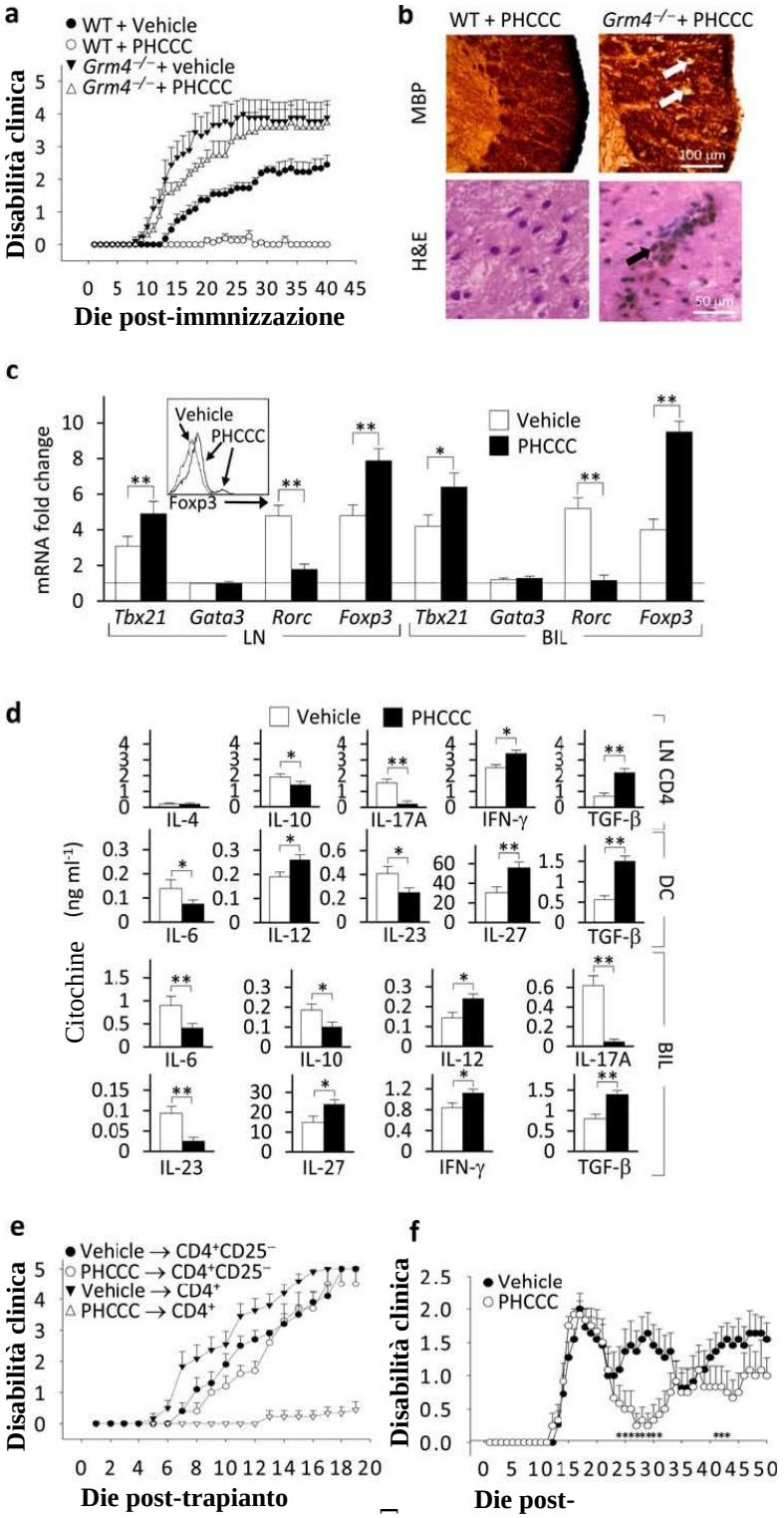
a cellule cDCs e pDCs spleniche estratte da topi WT o *Grm4*$^{-/-}$ incubati con il mezzo da solo (**c**) o in presenza di LPS (cDCs) o CpG-ODN (pDC). Dopo 24 ore, è stata misurata la concentrazione delle citochine nel surnatante delle culture. **b** espressione di IL-17A e IFN-γ nelle cellule T CD4^{+}, purificate dai linfonodi di topi WT o *Grm4*$^{-/-}$ e attivati con anticorpi specifici CD3-e CD28- in presenza di cDCs purificate dalla milza.

Figura 8: Il segnale dipendente da mGluR4 controlla la formazione di cAMP e la produzione di citochine.



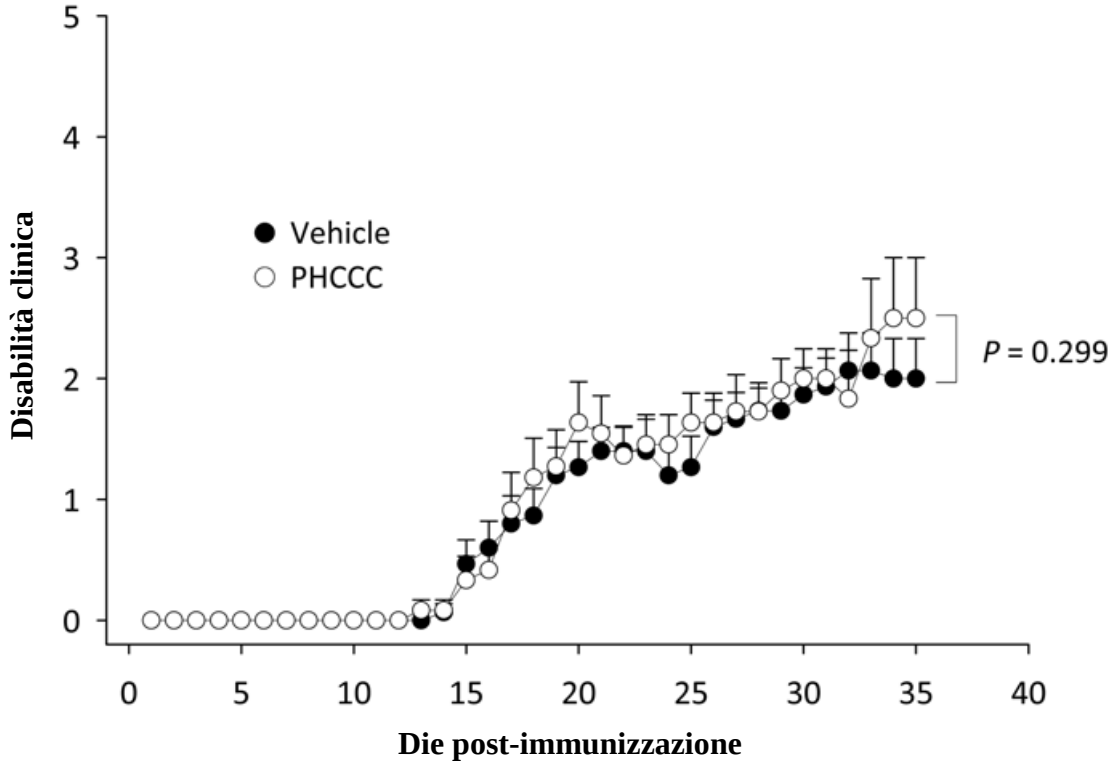
a Formazione di cAMP intracellulare, misurato in cDCs stimolate con forskolin (FSK) o LPS per 10 min in presenza o in assenza di L-AP4 o PHCCC. **b** le concentrazioni di citochine nel sovranatante di cellule cDCs estratte da WT o *Grm4*$^{-/-}$ stimolate con LPS per 24 ore in presenza di PHCCC (WT) o KT 5720 (*Grm4*$^{-/-}$).

Figura 9: il PHCCC attenua l'EAE



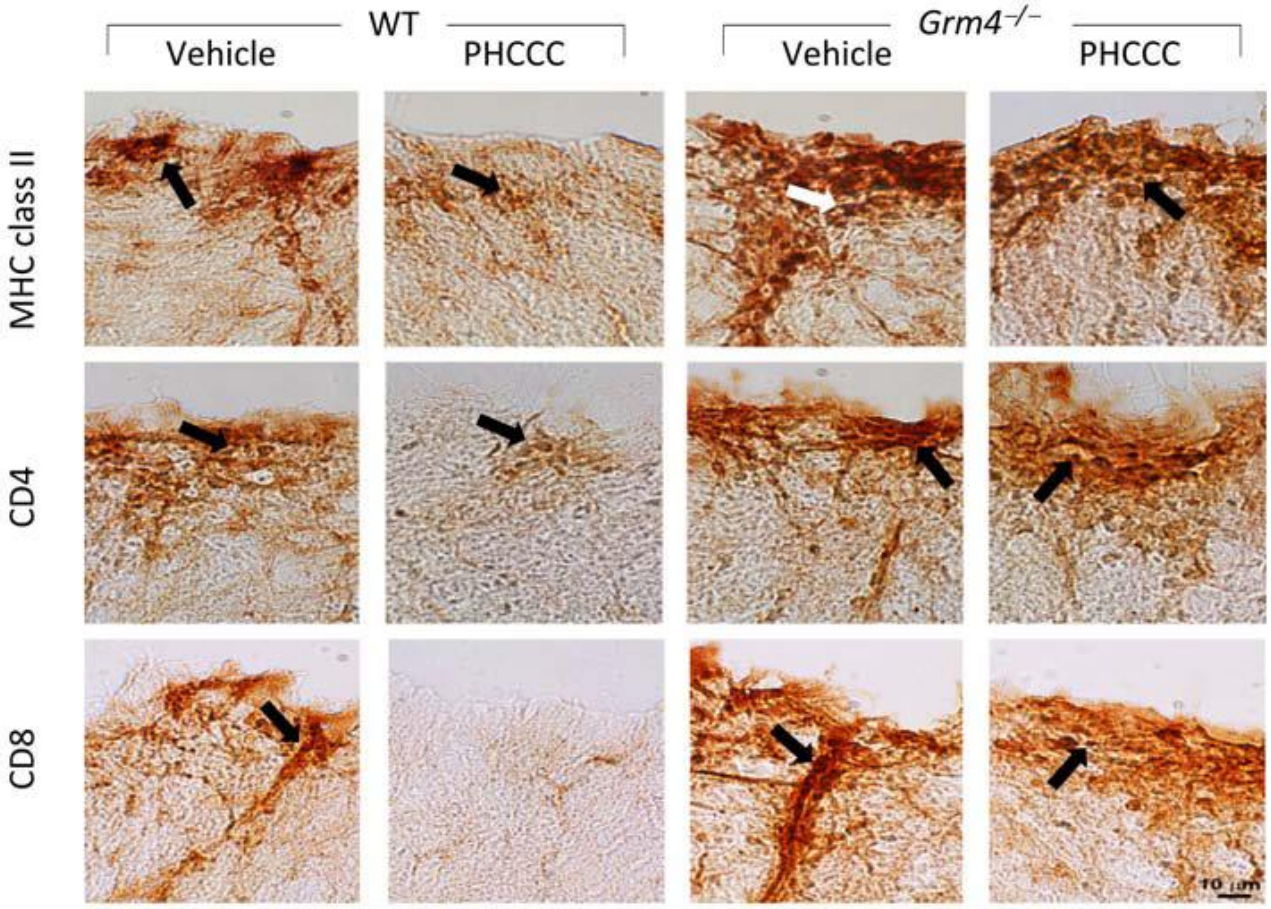
a Andamento clinico dell' EAE (medie ± s.d.) in topi WT e Grm4$^{-/-}$ vaccinati con MOG e trattati per via sottocutanea ogni giorno con PHCCC. **b** analisi istologica del midollo spinale a 30 d dopo immunizzazione **c** i livelli di trascrizione delle proteine indicate valutata in cellule T CD4^{+} derivanti da linfonodi a 10 D e BILs al 30 d dopo immunizzazione. **d** la produzione di citochine da parte delle cellule CD4^{+} (10 d), DCs splenica (10 d) e Bils (30 d) da topi WT trattati con PHCCC o veicolo. **e** EAE passiva indotta nei topi WT mediante trasferimento di cellule CD4 purificate a 18 d dopo immunizzazione dai linfonodi e dalla milza di topi WT e *Grm4*$^{-/-}$. **f** Andamento Clinico dell'EAE-RR (media ± SD) in topi SJL / J trattati giornalmente con PHCCC al momento della comparsa del primo attacco.

Figura 10: il PHCCC somministrato in terapia non migliora la sintomatologia



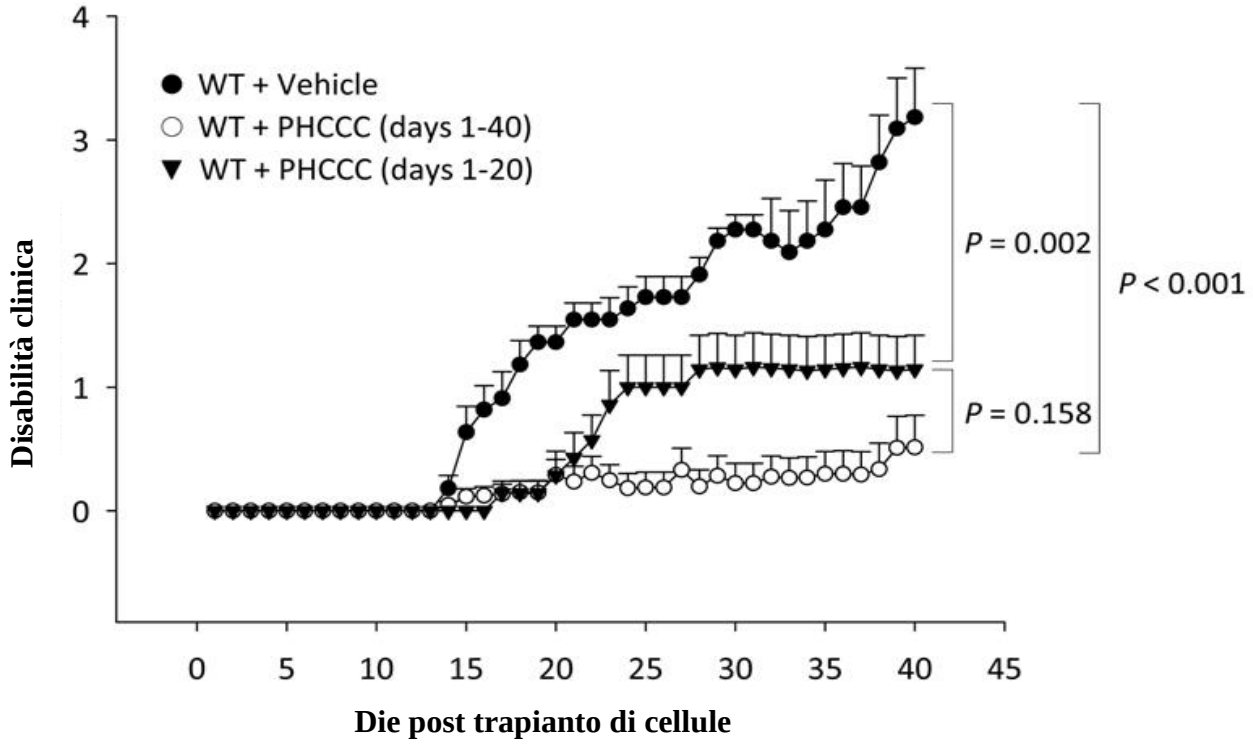
I topi WT sono stati immunizzati con il peptide MOG ed hanno ricevuto il PHCCC (3 mg / kg, n = 12) oppure il veicolo (N = 15) a partire da un giorno dopo la comparsa dei segni neurologici (16-19 d in questo esperimento).

Figura 11: il trattamento con PHCCC riduce l'infiltrato infiammatori nel SNC in animali WT, ma non *Grm4*$^{-/-}$ sottoposti a EAE.



Analisi del midollo spinale estratto da topi WT e *Grm4*$^{-/-}$ a 30 d dall'immunizzazione con MOG, trattati con veicolo o PHCCC, marcati con anticorpi anti-CD4, anti-CD8, e anti-MHC di classe II.

Fig 12 :L'effetto del PHCCC nell' EAE è in parte reversibile



I topi WT sono stati immunizzati con MOG ed hanno ricevuto il PHCCC (3 mg kg^{-1}) al 20° giorno di malattia a partire dal giorno della vaccinazione (n = 6) o 40° d (n = 6).

BIBLIOGRAFIA

[1] B. Bergamasco, R. Mutani, La neurologia di Bergamini, Edizioni Libreria Cortina, Torino 2007, pag 425-451.

[2] Medaer R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? Acta Neurologica Scandinavica1979 Sep;60(3):189-92.

[3] Murray TJ. Robert Carswell: the first illustrator of MS. International MS Journal. 2009 Sep;16(3):98-101.

[4] Pearce JM. Historical descriptions of multiple sclerosis. European Neurology. 2005;54(1):49-53.

[5] Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. Journal of Neurological Sciences. 2009 Feb 1;277

[6] Barnard, Jellinek.Multiple sclerosis with amyotrophy complicated by oligodendroglioma: History of recurrent herpes zoste.r Journal of the Neurological Sciences 1966

[7] Holmøy T. The discovery of oligoclonal bands: a 50-year anniversary. European Neurology. 2009;62(5):311-5.

[8] Rosati, G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview, Annual Neurology, 1994. 36 Suppl 2: p. S164-74.

[9] Wasay M., Khatri I.A., Khealani B., Sheerani M. MS in Asian countries, International MS Journal. 2006 May; 13 (2): 58-65. Review

[10] Poser, C.M., The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview, Annual Neurology, 1994. 36 Suppl 2: p. S180-93.

[11] Compston, A., The epidemiology of multiple sclerosis: principles, achivements, and recommendations, Annual Neurology, 1994. 36 Suppl 2: p.S211-7.

[12] Granieri E, Casetta I, Govoni V, Tola MR, Marchi D, Murgia SB, Ticca A, Pugliatti M, Murgia B, Rosati G.The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province. Neurology. 2000 Sep 26;55(6)

[13] Goodin DS.The genetic basis of multiple sclerosis: a model for MS susceptibility. BMC Neurology. 2010 Oct 28;10(1):101.

[14] Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Murru R, Muntoni F, Cucca F. DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. Human Molecular Genetics. 1998 Aug;7(8):1235-7.

[15] Pender MP. The Essential Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis..Neuroscientist. 2010 Nov 12.

[16] Fontoura P, Garren H.Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future.Results and Problems in Cell Differentation. 2010;51:259-85.

[17] Hu W, Lucchinetti CF The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. Seminars in Immunopathology. 2009 Nov;31(4):439-53.

[18] Chitnis T. The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. Internetional Review Neurobioly. 2007;79:43-72.

[19] McDonald WI, Miller DH, Barnes D. The pathological evolution of multiple sclerosis Neuropathology Applied Neurobiology. 1992 Aug;18(4):319-34.

[20] Miller DM, Allen R. Quality of life in multiple sclerosis: determinants, measurement, and use in clinical practice. Current Neurology and Neurosciences Report. 2010 Sep;10(5):397-406.

[21] Chris H. Polman, S.C.R, Gilles Edan, MD, Massimo Filippi, et al., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the McDonald Criteria. Annual Neurolgy, 2005. 58: p. 840-846.

[22] Hawkins C.P. & Wolinsky JS., Principles of treatments in multiple sclerosis, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000, 324.

[23] Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., Animal models. Annals of Neurology 1994.36, S47–S53.

[24] Lassmann, H., Ransohoff, R.M., The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. Trends in Immunology 2004. 25, 132–137.

[25] Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A., Revel, M., Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. European Journal of Neuroscience 1998.28, 1727–1737.

[26] Kuerten, S., Kostova-Bales, D.A., Frenzel, L.P., Tigno, J.T., Tary-Lehmann, M., Angelov, D.N., Lehmann, P.V., MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. Journal of Neuroimmunology 2007. 189, 31–40.

[27] Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2010 Oct;162(1):1-11.

[28] Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. Annals of Anatomy. 2010 Aug 20;192(4):179-93.

[29] Langrish, C.L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J. Exp. Med. 2005; 201, 233–240.

[30] Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 2006; 41, 235–238.

[31] Cua, D.J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 2003; 421, 744–748.

[32] Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nat. Rev. Immunol. 2009 9, 393–407.

[33] Axtell, R.C. et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. Nat. Med. 2010 16, 406–412

[34] Hohlfeld R, Meinl E, Dornmair K. B- and T-cell responses in multiple sclerosis: novel approaches offer new insights Journal of Neurological Science. 2008 Nov 15;274(1-2):5-8.

[35] Stoeckle C, Tolosa E.Antigen processing and presentation in multiple sclerosis. Results and Problems in Cells Differention. 2010;51:149-72.

[36] Pin, J.P., Duvoisin, R,. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology 1995 34, 1–26.

[37] Woiciechowsky, C. et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. Nature. Medicine 1998. 4, 808–813.

[38] Tracey, K.J. Reflex control of immunity. Nature Review Immunology. 2009 9, 418–428.

[39] Franco, R., Pacheco, R., Lluis, C., Ahern, G.P. & O'Connell, P.J. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. Trends Immunol. 2007. 28, 400-7.

[40] Storto, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. J. Neuroimmunol. 2000; 109, 112–120.

[41] Besong, G. et al. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. J. Neurosci. 2002; 22, 5403–5411

[42] Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. & Ben-Nun, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V expression of encephalitogenic T cells. Eur. J. Immunol. 1995 25, 1951-9.

[43] Mangano K, et al. Variable effects of cyclophosphamide in rodent models of experimental allergic encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2010 Feb;159(2):159-68.

[44] Fallarino, F. et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J. Immunol. 2006. 176, 6752–6761

[45] Grohmann, U. et al. CTLA-4–Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat. Immunol. 2002 3, 1097–1101.

[46] Schraml BU et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation.

Nature. 2009 Jul 16;460(7253):405-9.

[47] Grohmann, U. et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol. 2002 Nov;3(11):1097-101.

[48] Grohmann, U. et al. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. Nat Med. 2007 May;13(5):579-86.

[49] Liu T, Chambers TJ. Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain-associated T-cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD4+ lymphocytes. J Virol. 2001 Mar;75(5):2107-18.

[50] Fitzgerald DC. et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2007 Sep 1;179(5):3268-75.

[51] Fallarino F, et al. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone.J Exp Med. 2009 Oct 26;206(11):2511-26.

[52] Romani L, et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. Nature. 2008 Jan 10;451(7175):211-5.

[53] Ngomba RT, et al. Positive allosteric modulation of metabotropic glutamate 4 (mGlu4) receptors enhances spontaneous and evoked absence seizures. Neuropharmacology. 2008 Feb;54(2):344-54.

[54] Corti C, et al Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS.Neuroscience. 2002;110(3):403-20.

[55] Bruno V, et al. Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death.J Neurosci. 2000 Sep 1;20(17):6413-20.

[56] Fleming KK, et al. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis.J Neuroimmunol. 2005 Dec 30;170(1-2):71-84.

[57] Neufert, C. et al. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. 2007 Eur. J. Immunol. 37, 1809–1816.

[58] Schnurr, M. et al. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. Blood 2005.105, 1582–1589

[59] Li, K. et al. Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor–mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation. Blood 2008. 112, 5084–5094.

[60] Conn, P.J. & Pin, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1997. 37, 205–237.

[61] Zozulya, A.L., Clarkson, B.D., Ortler, S., Fabry, Z. & Wiendl, H. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. J. Mol. Med. 2010. 88, 535–544.

[62] Matute, C., Domercq, M. & Sanchez-Gomez, M.V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. Glia 2006. 53, 212–224.

[63] McDonald, J.W., Althomsons, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W. & Goldberg, M.P. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor–mediated excitotoxicity. Nat. Med. 1998.4, 291–297.

[64] Centonze, D. et al. The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. Cell Death Differ. 2010.17, 1083–1091.

[65] Pacheco, R. et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. J. Immunol. 2006.177, 6695–6704.

[66] 28. Storto, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. J. Neuroimmunol. 2000. 109, 112–120.

[67] Stover, J.F. et al. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. Eur. J. Clin. Invest. 1997. 27, 1038–1043;

[68] Pampliega, O. et al. Association of an EAAT2 polymorphism with higher glutamate concentration in relapsing multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 2008.195, 194–198;

.

RINGRAZIAMENTI

Molti lettori quasi sicuramente finiranno per leggere solo queste righe finali non per chissà quale motivo, ma semplicemente perché sono le uniche cose comprensibili per chi non ha frequentato il mio corso di dottorato; scrivere i ringraziamenti per le persone che hanno condiviso tre anni con la mia psicologia inversa non è facile ma, queste persone hanno condiviso con me attimi, frasi, parole e cori che mi accompagneranno per sempre ed è a questi che devo* il mio Grazie

"La vita è lotta, gioia e desio . Amore ed odio e poi addio"

A i miei mentori per avermi guidato in un nuovo mondo e per aver creduto in me fino in fondo; al Prof. RDM per il suo "fai ciò che puoi con chi sei dove sei e con ciò che hai" Alla Prof.ssa VB per avermi insegnato il principio della Causalità e per aver trasformato un "Salve" in amicizia…Al Dott.re GB e la sua teorie dei pali. Al Prof. FN per la pacca sulle spalle seguita da un non ti preoccupare e per essere stato il primo ad aver creduto in me. Al Prof. RG ed il suo "May I introduce myself (may I introduce…)?",per l'appuntamento all'incrocio della fifty avenue e il semaforo e per aver condiviso i miei voli pindarici. All Dott.re RNG (e qui ne avrei diverse) per il suo "clicca n'ggoppa, Zunami, caso frega a me e ho la testa razzata!"

A voi senza i quali non sarei mai potuta arrivare a questo punto, non solo per il sostegno economico, che sicuramente è stato indispensabile, ma per aver celato con silenzio l'ansia (per le mie avventure) ed averla trasformata in incoraggiamento; per le volte che convinti che non stessi ascoltando, parlavate di me orgogliosi, dimenticandovi del mio caratterino non facile. Alle S per l'aiuto tacito o esplicito che tante volte è venuto dal loro cuore e per far parte della mia vita ancora prima che nascessi

Ad un "sto tornando" e alla sua espressione dopo un "mo' bec'I"
Ad un "ta' mie' a qcuist" e "Sant' Asc"

A Sereeeeeeeeeee
A"Séreee è ménta" e per il suo "Nonononononooo" al Tequila Bar
A "che cavolo stai dicendo willie???", a "ECCO lo sapevo!!!" a e NON C'ENTRAVA NIENTE"
A "fessacchiotta" e a "Brava"
A "San'Gerard"
A "le razioni interpersonali sono sempre una cosa difficile"
A chi crede che i Gechi parlino; ad un "c'era una volta un filosofo, che disse… no un re, no, era un… Alessandro magno che disse" e che mi ha anche insegnato "che l'occhio non vede quello che la mente non conosce"
A "ZIAAAAAA sei TORNATA" accompagnato da mega sorrisi e abbracci
A 3 parole e "ad essere felice di essere felice" e soprattutto al suo eh no eh!!
A "la capa nadda mai pati!"
A il prato è MEGLIO!
A tutti gli –ISSIMI che solo lei può racchiudere in una frase
Ad un "bionda da gli occhi arrossati ed i pili in du nasooo"
Ad uno "stai calma"
Ad un "la so battezzata come l'acqua santa"

*e già qui mi viene in mente una persona che mi direbbe non dire "devo" ma "posso":D

A tante, troppe birre su di una panchina a Sant'Agapito
Ad un "TAAAC"
Alla mia psicologa online
Ad un "C'avemo 'na Scienziata; ARAiaraO" ed alla sua imitazione dello squalo
A annina stai zitta!!!!
A "povera CITRAMEA"
Ad un Heeeee
Ai miei cuccioli di lab.
A "eche sce'm'noit"
A come fai ridere tu
All' HIO4 sempre presente
A te che quando ti parlo di marcatori nel liquor pensi a Totti e Borriello
Ad Help us
Alla cicatrice di una scottatura indelebile sul mio braccio e al mais!
Alla pancia che cresce
Ai punti di sospensione
A 768 gradini

Grazie ancora a: i periciti, a nicandra, a gli occhi a cinesina ed alla cinese (òOoòòo), ad una scimmia sulla spalla, a caramella, alla luna, a maria nazionale, a era ieri, a nature,all'accappatoio bagnato, al piumone nero, alla Magica, l'autosuicidio, ad un napoletano in Germania, alla prestigiribidazione con i capelli, alla notte più lunga del mondo a Lille, a cick to cick, all'isernina, alle foche e alla risata a fochina, a coccorito, a eco, alla palla vicino l'ano, al buon giorno stellina, alla sinopsi, festarolo, ad uno scontrino maggiorato al casello, alla trombetta insita, a tanta festa, ai maβ bier, ai miei fumetti, alle notti insonne, alle serate Dignità, alla Ciocco-Latta, ad una pecora, ad un tre per otto biscotto.

ed un sincero ringraziamento personale al traduttore automatico, che regala sempre attimi di gioia non programmata.

L'ultimo Grazie ai viaggi ed ai luoghi che ho condiviso con diverse persone che mi hanno lasciato ricordi veramente speciali…….

...e a te che aspetti con trepidazione il mio ritorno!