

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze

Direttore: Prof. Paolo F. Nichelli

**Bande Oligoclonali IgM liquorali sono predittive di conversione
precoce a Sclerosi Multipla in pazienti con Sindrome Clinicamente
Isolata**

RELATORE:

Prof. Paolo Frigio Nichelli

CORRELATORE:

Dr.ssa Patrizia Sola

DOTTORANDA:

Dr.ssa Diana Ferraro

Dottorato in Neuroscienze XXVI Ciclo (2011-2013)

Direttore: Prof. Michele Zoli

Sommario

PREMESSA	- 3 -
SCLEROSI MULTIPLA.....	- 5 -
Epidemiologia	- 6 -
Eziopatogenesi	- 7 -
Diagnosi e decorso	- 13 -
SINDROME CLINICAMENTE ISOLATA	- 17 -
Definizione	- 17 -
Trattamento precoce	- 17 -
Fattori predittivi di conversione a SM	- 20 -
OBIETTIVO	- 33 -
MATERIALI e METODI.....	- 33 -
Selezione dei pazienti e raccolta dati.....	- 33 -
Procedure di Laboratorio	- 34 -
Analisi statistiche	- 34 -
RISULTATI	- 35 -
Popolazione in esame	- 35 -
Analisi statistiche	- 40 -
DISCUSSIONE.....	- 49 -
CONCLUSIONI.....	- 61 -
BIBLIOGRAFIA.....	- 62 -
RINGRAZIAMENTI.....	- 75 -

PREMESSA

Per Sindrome Clinicamente Isolata (CIS) si intende un primo evento infiammatorio demielinizzante a carico del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Essa può costituire un evento isolato oppure rappresentare la prima manifestazione di una malattia infiammatoria cronica del SNC: la Sclerosi Multipla (SM).

Il trattamento preventivo con farmaci immunomodulanti è in grado di ritardare la eventuale conversione a SM in pazienti con CIS e di rallentare il decorso della malattia. Tuttavia, il riscontro clinico di pazienti con decorso “benigno” di SM, che non accumulano invalidità significativa dopo 15-20 anni di malattia anche in assenza di trattamento, pone molti dubbi sull'indicazione estensiva all'uso di terapie, comunque non prive di effetti collaterali e molto costose. Inoltre, non tutti i soggetti con CIS svilupperanno la SM. Di qui la necessità di avere dei fattori predittivi di conversione a SM, che aiuterebbero a identificare i pazienti che potrebbero beneficiare di un trattamento immunomodulante precoce e quelli, invece, per i quali sarebbe indicata una condotta d'attesa.

Evidenze di letteratura indicano come la presenza di lesioni della sostanza bianca alla RM encefalo e la presenza di bande oligoclonali IgG liquorali abbiano un elevato potere predittivo positivo per lo sviluppo di SM. Inoltre, alcuni studi recenti suggeriscono che la presenza bande oligoclonali IgM (IgMOB) liquorali sia associata ad un aumento del rischio di conversione a SM nei pazienti con CIS, oltre che ad un decorso più aggressivo di malattia. Tuttavia, a tutt'oggi, la ricerca delle IgMOB nel liquor non fa parte degli esami diagnostici di routine utilizzati per i pazienti con CIS.

Lo scopo di questo studio è di valutare nei pazienti con CIS, il ruolo prognostico di dati clinici, neuroradiologici e liquorali, inclusa la presenza di IgMOB, all'esordio di malattia, nel predire la probabilità di conversione a SM.

Tali informazioni potrebbero rivelarsi utili nella pratica clinica ed avere numerose implicazioni, sia per il paziente, che si trova ad affrontare l'incertezza del futuro, che per il medico, che sarà in grado di consigliare al meglio il paziente, soprattutto in merito alla possibilità di iniziare una terapia di prevenzione precoce.

SCLEROSI MULTIPLA

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, demielinizzante e neurodegenerativa del sistema nervoso centrale (SNC), che rappresenta la causa più comune di disabilità nei giovani adulti dopo i traumi (*Andersen, 1998; Trapp, 2008*). Nella maggior parte dei casi (70%) la malattia colpisce i giovani adulti tra i 20 ed i 40 anni (*Duquette, 1987; Ghezzi, 1997; Masson, 2008*). La malattia esordisce nella maggior parte dei casi in modo acuto o subacuto, con sintomi e segni neurologici variabili, che sono espressione di danno mono o multifocale. Il decorso della malattia nelle forme tipiche è caratterizzato da una prima fase a ricadute e remissioni, con recupero totale o parziale del deficit neurologico, seguita, dopo un numero variabile di anni, da una seconda fase con decorso progressivo e accumulo di disabilità. L'estrema variabilità del quadro clinico non consente di prevedere le conseguenze a lungo termine sull'autonomia e sulla qualità della vita delle persone malate, tuttavia gli studi sulla storia naturale della SM indicano che dopo 15 anni dall'esordio, circa il 50% dei pazienti sarà dipendente nella deambulazione e molti necessiteranno di sedia a rotelle (*Weinshenker, 1989a*).

Queste caratteristiche, unitamente all'imprevedibilità del decorso e alla mancanza di fattori di prognosi attendibili, rendono ragione delle numerose e gravi implicazioni che riguardano la qualità della vita e gli aspetti socio-economici dei malati di SM, colpiti generalmente nella fase più progettuale della vita e nel pieno della loro capacità professionale, affettiva, genitoriale e sociale. Infine, la giovane età dei pazienti, la lunga durata di malattia, la perdita di produttività che ne consegue ed il costo delle terapie farmacologiche, rendono la SM una patologia ad elevatissimo impatto sulle risorse socio-sanitarie.

Epidemiologia

Nel mondo ci sono circa 1,3 milioni di persone affette da SM, di cui 400.000 in Europa e 57.000 in Italia. Come tutte le malattie autoimmuni, la SM è più frequente negli individui di genere femminile: si stima che il 70% di tutti i pazienti con SM siano donne (*Duquette, 1992; Jacobs, 1999*). Fa eccezione la forma primariamente progressiva, che interessa con la medesima frequenza i due sessi (*McDonnel, 1996*).

In Italia sono riportati tassi di prevalenza compresi tra 40 e 70 casi per 100.000 abitanti e tassi d'incidenza in aumento negli ultimi decenni, da 2,3-3,9 nel periodo 1990-1993 a 4,2 per 100.000 abitanti nel 1995-1999, con notevoli differenze tra le diverse regioni. L'incidenza è significativamente più alta in Sardegna, con un tasso di 6,8/100.000 abitanti, registrato nel 1993-1997 (*Pugliatti, 2006*). Il trend in crescita è confermato anche da studi condotti in Emilia-Romagna nella provincia di Ferrara (*Granieri, 2007*), che riportano tassi di prevalenza più elevata rispetto agli anni precedenti, pari a 120 casi per 100.000 abitanti, con una incidenza annuale di 4,35 nuovi casi per 100.000 abitanti. In base a questi dati, considerando che la popolazione dell'Emilia Romagna è di oltre 4.000.000 di abitanti, è possibile stimare una prevalenza di 4000-5000 casi di SM sull'intero territorio regionale.

La distribuzione della malattia non è uniforme nel mondo: molti studi epidemiologici hanno evidenziato come essa sia più diffusa nelle zone lontane dall'equatore a clima temperato, seguendo un gradiente di latitudine (*Ebers., 2008*).

Eziopatogenesi

L'etiologia della SM è tuttora sconosciuta, sebbene sia generalmente condiviso il ruolo critico di una deviata risposta del sistema immunitario nello sviluppo della malattia. Tuttavia, le malattie a patogenesi autoimmunitaria dell'uomo, spesso croniche, hanno basi eziologiche complesse, dove sia la suscettibilità genetica che fattori di rischio ambientali rivestono entrambi ruoli fondamentali.

IMMUNOPATOGENESI

La SM è caratterizzata dal punto di vista morfologico da infiammazione, demielinizzazione, perdita assonale e gliosi (*Trapp, 2008*). E' ancora oggi molto discusso il ruolo che rispettivamente rivestono l'infiammazione e la neurodegenerazione nella genesi della malattia e nell'accumulo di disabilità, anche se la maggior parte dei ricercatori sostiene che, almeno nelle forme recidivanti-remittenti, l'infiammazione acuta sia il processo patologico predominante. Al contrario, nelle forme progressive di malattia, prendono il sopravvento processi di tipo neurodegenerativo.

Ruolo dell'immunità cellulare nella SM

L'alterazione della risposta immune, in particolare delle cellule T autoreattive, è considerata alla base della cascata di eventi che portano a demielinizzazione, infiammazione e danno neuronale, anche se resta ancora molto da capire riguardo a come siano generati e controllati questi processi. Gli studi classici di immunologia riportano che cellule T con profilo citochinico Th-1 (T helper-1) possono essere isolate e clonate dal sangue periferico dei pazienti con SM. Queste cellule, successivamente al riconoscimento di componenti della

mielina, secernono grandi quantità di interferone gamma (IFN- γ) (*Ota, 1990*) e sono state per molto tempo considerate responsabili del danno immunologico.

Le cellule CD4⁺ mediano il danno alla mielina sia direttamente, secernendo citochine pro-infiammatorie (IFN- γ e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), sia indirettamente, richiamando altre cellule del sistema immunitario, quali le cellule B produttrici di anticorpi, macrofagi e cellule microgliali (fagocitosi, presentazione dell'antigene e produzione di citochine), mastociti (degranolazione) e cellule natural killer (NK) ad azione citotossica. Tutte queste cellule contribuiscono a perpetuare l'infiammazione nel SNC, causando un danno neuronale. Le evidenze più stringenti a favore di questo scenario sono date dai modelli animali di encefalite allergica sperimentale (EAE)

I potenziali autoantigeni riconosciuti dalla cellula T autoreattiva comprendono, oltre a proteine e lipidi associati alla membrana mielinica, quale ad esempio la proteina basica della mielina (MBP), anche antigeni non mielinici, che possono essere coinvolti, quali α B-cristallino, "heat shock proteins" e proteine associate agli astrociti. Per lungo tempo si è ritenuto che le cellule CD4⁺ che causano l'EAE avessero un profilo citochinico predominante di tipo Th-1 (*O'Garra, 1997*), tuttavia, questo dogma è stato recentemente ridiscusso, grazie alla scoperta del ruolo critico dell'IL-23 nello sviluppo dell'EAE. Questa citochina sarebbe coinvolta nello sviluppo di una sottopopolazione di CD4⁺, chiamata Thelper-17 (Th-17), in grado di secernere IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22 e TNF α (*Korn, 2009*). Sebbene questa sottopopolazione di linfociti sia ancora oggetto di studi e discussioni, un elevato numero di cellule CD4⁺ e CD8⁺ positive per IL-17 è stato riscontrato nelle placche attive (*Tzartos, 2008*), così come è stata individuata un'elevata espressione di IL-17 da parte di linfociti ottenuti dal liquor (*Matusevicius, 1999*). Inoltre, i linfociti umani Th-17, sono in grado di promuovere il danno di barriera emato-encefalica (BEE) e causare la morte dei neuroni in

vitro, dimostrando ulteriormente il loro ruolo patogeno (*Viglietta,, 2004*). Pur senza escludere un ruolo delle cellule Th-1 nella patogenesi della SM, queste osservazioni indicano un ruolo cruciale delle cellule Th-17 per le patologie autoimmunitarie del SNC (*Kroenke,2008*).

Ruolo dell'immunità umorale nella SM

E' sempre più evidente che non solo le cellule T, ma anche le cellule B giocano un ruolo patogenetico fondamentale nello sviluppo della SM. Vi sono infatti crescenti evidenze negli ultimi anni a favore del ruolo degli autoanticorpi e delle cellule B nella patogenesi della malattia.

Nella SM l'importanza della risposta immune umorale è nota fin da quando Kabat trovò elevati valori di Ig nel liquor (*Kabat, 1948*). Nell'ultimo decennio le conoscenze sul ruolo delle immunoglobuline, degli autoanticorpi, e dei disordini immunologici mediati dalle cellule B e T si sono ampliate grazie a studi eseguiti in vitro, in vivo e su modelli animali quali i topi transgenici e nelle varianti dell'encefalomielite virale. Da questi studi è emerso come nella patogenesi delle malattie demielinizzanti umane immunomediate siano importanti sia la componente cellulare che quella umorale.

I fattori che suggeriscono un ruolo patogenetico delle cellule B e degli anticorpi nella SM sono:

- La sintesi intratecale delle immunoglobuline (Ig), riscontrata nel liquor del 90-95% dei pazienti affetti da SM;
- La presenza di cloni espansi di cellule B nelle lesioni croniche di SM e nel liquor (*Colombo, 2000; Baranzini, 1999; Owens, 1998 e 2003; Qin, 1998; Meinel, 2006*);

- L'identificazione istopatologica di demielinizzazione anticorpo-mediata (*Lucchinetti, 1996, Storch, 1998*);
- L'efficacia di trattamenti che hanno come bersaglio le cellule B (anticorpi monoclonali anti CD20) in *trials* di fase II e studi open-label. (*Bar-Or, 2008; Hauser, 2008*).
- Il riscontro di follicoli ectopici meningei contenenti centri germinativi nei pazienti con Sclerosi Multipla secondariamente progressiva (*Serafini, 2004*)

Le cellule B, oltre a produrre anticorpi, possono contribuire al danno tissutale come cellule presentanti l'antigene (APC) e rilasciando citochine. A loro volta, gli anticorpi possono esercitare un effetto patogeno attraverso meccanismi di citotossicità complemento-mediata anticorpo-dipendente e di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente.

Studi immunoistochimici e molecolari hanno mostrato il coinvolgimento degli anticorpi nell'iniziale sviluppo della placca di demielinizzazione (*Gay, 1997; Barnett, 2004; Genain,, 1999*): è stato infatti riportato che la deposizione di Ig co-localizza con frammenti attivi del complemento ai bordi attivi delle placche (*Gay, 1997; Storch, 1998; Lucchinetti, 2000*).

FATTORI GENETICI

Nonostante la SM si manifesti sporadicamente e non sia pertanto una malattia genetica in senso classico, l'esistenza di gruppi famigliari di pazienti e l'associazione tra determinati aplotipi HLA e geni di suscettibilità suggeriscono un ruolo importante dei fattori di rischio genetico nella etiopatogenesi della malattia. In particolare, studi su famiglie e su gemelli (*Ebers, 1994; Compston,1992;*) hanno evidenziato che, rispetto alla popolazione generale, con un rischio di malattia dello 0,2%, nei familiari di pazienti affetti da SM il rischio sale al 3% nei parenti di primo grado ed all'1% in quelli di secondo grado (*Compston, 1997*). Studi

molto importanti sui gemelli, riportano una concordanza di circa il 25% nei monozigoti, del 5,4% nei dizigoti e del 2,9% nei fratelli non gemelli (*Willer, 2003*).

Per quanto riguarda l'associazione con gli aplotipi HLA, gli studi di popolazione hanno dimostrato nei pazienti caucasici affetti da SM, un'associazione, con gli alleli di classe II DRB1*1501, DRB5*0101 e DQB1*0602 del complesso maggiore di istocompatibilità (MCH). Questi alleli sono tutti presenti nell'aplotipo DR2, l'unico ad essere stato associato alla malattia. Le analisi genotipiche e fenotipiche hanno evidenziato che la suscettibilità è mediata probabilmente da un insieme eterogeneo di geni che interagiscono in maniera epistatica. In questo tipo d'interazione il genotipo di un *locus* influenza l'espressione fenotipica del genotipo di un altro *locus* (*McDonald WI. e Noseworthy JH., 2004*).

Pertanto, questi recenti studi di epidemiologia genetica suggeriscono un'ereditarietà di tipo poligenico, che non può comunque prescindere dall'influenza dei fattori ambientali per lo sviluppo della malattia conclamata.

FATTORI AMBIENTALI

L'ipotesi che un fattore ambientale possa giocare un ruolo cruciale nello sviluppo della SM nasce soprattutto dagli studi epidemiologici, dall'irregolare distribuzione geografica della prevalenza della malattia e dagli studi sui flussi migratori (*Kurtzke, 1985*). Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che esiste un gradiente nord-sud ed est-ovest: in particolare la prevalenza della malattia aumenta con la latitudine, probabilmente in associazione ai livelli di esposizione alla radiazione ultravioletta (*Ebers, 2008*). Studi ormai storici sulle migrazioni (*Kurtzke, 1980*) hanno evidenziato che la migrazione prima della pubertà (circa 15 anni) da un'area a basso rischio di malattia verso un'area ad alto rischio e viceversa determina l'acquisizione del rischio della 'popolazione di adozione'. Viceversa, se la migrazione

avviene successivamente ai 15 anni di età, il rischio rimane quello del paese di origine. Questi studi hanno indotto a considerare che un agente infettivo, contratto in giovane età, potesse essere in relazione allo sviluppo della SM. La prevalenza della SM mostra differenze anche all'interno dei singoli paesi ad alto rischio: in Norvegia la SM è cinque volte più diffusa nelle aree interne, rispetto alle aree costiere, in Canada la prevalenza nelle province interne è doppia (100-155:100.000) rispetto all'isola di Newfoundland (50:100.000), in Nuova Zelanda, in Corsica e in Costa Azzurra è riportato un ridotto rischio d'incidenza, costante anche lungo tutta la costa Atlantica. Questa microeterogeneità suggerisce un'influenza ambientale di tipo climatico. Infatti, la quantità di luce solare durante il periodo invernale sembra essere associata al tasso di prevalenza: l'elevata esposizione alla luce solare durante l'infanzia e l'adolescenza è correlata ad una bassa prevalenza di malattia. (*Compston A. & Coles A., 2008; Ebers, 2008*).

Gli studi epidemiologici che hanno riportato un possibile ruolo dell'esposizione alla luce solare in giovane età come possibile concausa di SM, hanno suscitato un particolare interesse sul possibile ruolo della vitamina D. Una carenza di vitamina D potrebbe rappresentare un cofattore nel rischio di contrarre la SM ed è stato suggerito che alti livelli di vitamina D possono ridurre il rischio di sviluppare la malattia (*Munger, 2006*). L'azione della vitamina D sarebbe principalmente diretta verso i linfociti T-CD4+ (Th-1, Th-2, Th-17), principali effettori delle malattie autoimmuni: essa inibisce le cellule Th-1, la produzione di citochine proinfiammatorie IL-2, IFN- γ , e TNF- α (*Lemire JM. and Archer, 1991*) ed ha un'importante ruolo nella loro regolazione funzionale e differenziativa. La diminuzione della vitamina D sarebbe in grado d'indurre, in modelli animali, sintomi immunomediati, malattie autoimmuni come artrite reumatoide, diabete mellito di tipo I, LES ed infezioni virali (*Liu, 2006*).

L'ipotesi di un ruolo infettivo nella genesi della SM risale a più di cento anni fa ed è stata continuamente riproposta come possibile meccanismo patogenetico. Tra gli agenti infettivi più studiati vi sono i virus (ad es. Virus di Epstein Barr e Human Herpes Virus 6).

Alla luce di dati sperimentali ottenuti sugli animali e dalle osservazioni compiute sull'uomo, le ipotesi sui possibili meccanismi mediante i quali un agente virale potrebbe interferire con il sistema immunitario sono:

- Meccanismi di mimesi molecolare;
- Rilascio di superantigeni;
- Attivazione di cloni quiescenti di cellule T autoreattive;
- Aumento dell'espressione cellulare di antigeni di istocompatibilità HLA, recettori per virus, che normalmente non sono espressi;
- Riattivazione di altri virus o retrovirus endogeni ed esogeni, presenti allo stato latente nella cellula ospite.

Diagnosi e decorso

Modalità di diagnosi

La diagnosi di SM si basa sulla dimostrazione, attraverso evidenze anamnestiche, cliniche e strumentali, della presenza di lesioni demielinizzanti del SNC disseminate nello spazio (più sedi lesionali) e nel tempo (due o più episodi di demielinizzazione) e l'esclusione di diagnosi alternative ("no better explanation").

Ad oggi non esiste un singolo e specifico test che permetta di definire la diagnosi di SM, si tratta perciò di un processo diagnostico complesso, che spesso non si esaurisce in un unico atto clinico e può richiedere la collaborazione di diversi specialisti.

I criteri attualmente utilizzati per la diagnosi di SM sono quelli di Mc Donald del 2010 (*Polman, 2011*) che consentono una diagnosi più precoce poiché la disseminazione temporale, che in passato veniva dimostrata con un secondo attacco clinico o una RM successiva con lesioni nuove, attualmente può essere teoricamente dimostrata già al momento dell prima RM, se coesistono lesioni gadolinio-positive (Gd+) (che si impregnano con il mezzo di contrasto paramagnetico, gadolinio, indicando una lesione recente con rottura della barriera emato-encefalica) e lesioni gadolinio-negative (Gd-).

La *disseminazione nello spazio* può essere dimostrata con la presenza di una sola lesione T2 in almeno due siti del sistema nervoso centrale: midollo, periventricolare, juxtacorticale, sottotentoriali, o spinale.

La *disseminazione temporale* può essere dimostrata dalla contemporanea presenza di una lesione T2 Gd+ e una lesione non captante. Queste lesioni possono essere valutate/visionate o direttamente alla RM basale o in una RM successiva con riferimento ad una scansione di base, indipendentemente da quando la RM basale sia stata ottenuta.

Quando al primo evento demielinizzante fa seguito un secondo episodio clinico (ricaduta) si parla di Sclerosi Multipla Clinicamente Definita (SMCD)

Decorso

Sia dal punto di vista patologico (*Lucchinetti, 2000*) che radiologico (*Bielekova, 2005*), la SM è caratterizzata da una estrema eterogeneità, che si esprime in un decorso clinico che varia da forme dette 'benigne' di malattia, in cui anche a distanza di 10-15 anni dall'esordio la disabilità è minima, a forme progressive e invalidanti e, più raramente, a forme fulminanti (*Noseworthy, 2000*). I fattori che contribuiscono alla variabilità ed imprevedibilità del decorso sono molteplici. La malattia ha notoriamente un andamento casuale in termini di

frequenza e gravità delle esacerbazioni, di entità e velocità della progressione e dell'accumulo della disabilità. Gli studi di RM hanno dimostrato che le lesioni si presentano più spesso rispetto a quanto sia evidenziabile clinicamente (*Ansink, 1985; Miller, 1996*).

La classificazione della Sclerosi Multipla definita in base al decorso permette di identificare 4 forme cliniche principali di SM (*Lublin e Reingold, 1996*):

- a) Remittente recidivante (RR)
 - b) Primariamente progressiva (PP)
 - c) Secondariamente progressiva (SP)
 - d) Progressiva recidivante
- a) Remittente recidivante (RR): caratterizzata da ricadute clinicamente definite, seguite da un grado di recupero variabile (completo o con sequele e deficit residuo), con un decorso stabile tra gli attacchi. Le ricadute sono definite come episodi di peggioramento acuto della funzione neurologica, caratterizzati da nuovi sintomi o segni presenti per almeno 24 ore e non associati a rialzo febbrile. Si tratta della più comune forma di esordio della SM. I pazienti con SM-RR possono sviluppare anche grave disabilità, a gradini, quando il recupero dai singoli attacchi è incompleto. Questo non dovrebbe essere confuso con il graduale e continuo peggioramento che si realizza nelle forme progressive.
- b) Primariamente Progressiva (PP): caratterizzata da progressione di malattia fin dall'esordio con occasionali plateaux. L'elemento essenziale della SM-PP è un peggioramento graduale, quasi continuo, con minori fluttuazioni, ma senza chiare recidive.
- c) Secondariamente progressiva (SP): è caratterizzata da un iniziale decorso RR di malattia, seguito da progressione, con o senza occasionali recidive, lievi remissioni e plateaux. La SM-SP può essere considerata l'esito a lungo termine della SM-RR.
- d) Progressiva recidivante (PR): è definita come una malattia progressiva sin dall'esordio, con sovrapposte recidive acute con o senza recupero; i periodi tra le recidive sono caratterizzati da progressione continua.

Nel singolo paziente il decorso di malattia è altamente variabile e imprevedibile (*Lublin e Reingold, 1996; Weinshenker, 1989a; Kurtzke, 1983; Noseworthy, 1999*) e, almeno nelle fasi iniziali di malattia, l'impatto maggiore sulla qualità della vita del paziente e della sua famiglia, al di là dalle limitazioni fisiche, è dovuto al disagio ed alla sofferenza psicologica causata dall'apprendere la diagnosi e soprattutto dall'incertezza relativa al decorso, alla progressione di malattia ed alla possibile disabilità futura.

SINDROME CLINICAMENTE ISOLATA

Definizione

Con il termine CIS (*Clinically Isolated Syndrome*) o sindrome clinicamente isolata si intende un episodio clinico isolato, caratterizzato da un disordine neurologico acuto o subacuto suggestivo di demielinizzazione, in assenza di criteri sufficienti per diagnosi di SM, con durata di almeno 24h (*Frohman, 2003; Miller, 2005*).

La CIS è comunemente considerata la manifestazione clinica precoce della SM, anche se non tutti i soggetti con CIS svilupperanno necessariamente la malattia. Infatti, solo una percentuale variabile di pazienti con CIS, dal 30% al 70%, svilupperanno una SM definita (*Miller, 2005*).

Si stanno compiendo molti sforzi per identificare i pazienti con CIS che abbiano un elevato rischio di conversione ad SM poiché un loro precoce riconoscimento permetterebbe di instaurare una terapia di prevenzione precoce, il cosiddetto “early treatment”, ritardando così la conversione da CIS ad SM.

Trattamento precoce

Importanti studi hanno dimostrato come il trattamento precoce con Interferone- β o Glatiramer Acetato, dopo il primo episodio demielinizzante, sia in grado di ridurre il numero di ricadute, l'attività di malattia e il carico lesionale alla RM, riducendo notevolmente il rischio di sviluppare una SMCD ed una invalidità futura e determinando complessivamente un miglioramento della salute e della qualità di vita del paziente.

Tra gli studi più importanti possiamo citare: lo studio CHAMPS (*Controlled High-Risk Subjects Avonex Multiple Sclerosis Prevention*) (Jacobs, 2000), lo studio ETOMS (*the Early Treatment of MS*) (Comi, 2001), lo studio BENEFIT (*the Betaferon in Newly Emerging Multiple Sclerosis for Initial Treatment*) (Kappos, 2009) e lo studio PreCISe (Comi, 2009).

In particolare, lo studio CHAMPS (Jacobs, 2000), condotto su 383 pazienti con CIS o con lesioni demielinizzanti subcliniche alla RM, ha permesso di evidenziare l'efficacia dell'Interferone β -1a nel ridurre significativamente la probabilità cumulativa di sviluppare una SMCD definita rispetto al gruppo placebo (HR=0,56; 95% [CI]: 0,38-0,81; p=0.002). Questo studio ha inoltre dimostrato una riduzione della comparsa e/o ingrandimento delle lesioni presenti alla RM (p<0.001) e di quelle Gd+ a 18 mesi (p<0.001). A tre anni dall'esordio di malattia la probabilità cumulativa di una ricaduta di malattia, con conversione a SMCD, era del 35% per il gruppo trattato vs il 50% del gruppo placebo. Il trattamento si è dimostrato in grado di prolungare di circa 13 mesi l'intervallo di tempo tra il primo e secondo episodio di malattia.

Anche lo studio ETOMS, un trial della durata di 2 anni, in doppio cieco randomizzato e controllato, ha valutato gli effetti del trattamento precoce con interferone β -1a (22 μ g, somministrazione settimanale) sul rischio di conversione a SMCD in pazienti con CIS. Dopo 2 anni il 34% dei pazienti che avevano ricevuto il trattamento con interferone β -1a (IFN?) ed il 45% dei pazienti del gruppo placebo avevano ricevuto una diagnosi di SMCD (p=0,047). Inoltre, considerando il momento in cui il 30% dei pazienti CIS trattati avevano avuto conversione a SMCD, i dati evidenziavano che il tempo intercorso era significativamente più lungo nel gruppo trattato rispetto a quello placebo (569 giorni vs 252; HR=0,65, 95% [CI]: 0,45-0,94; p=0,034), posticipando di circa un anno la diagnosi di SMCD. Infine, sia il numero di nuove lesioni che l'accumulo del carico lesionale alla RM erano

significativamente ridotte nel gruppo trattato, con un rallentamento della progressione dell'atrofia cerebrale nei pazienti con CIS (*Comi, 2001*).

Lo studio BENEFIT, ha analizzato gli effetti dell'interferone β -1b (250 μ g, somministrazione giornaliera) somministrato in un gruppo di pazienti con CIS, confrontato con un gruppo controllo trattato con placebo. A due anni, i risultati hanno mostrato un allungamento del tempo intercorso tra il primo e secondo evento demielinizzante nel gruppo trattato, rispetto al gruppo placebo (HR=0,50; 95% [CI]: 0,36-0,70; p<0,0001), con una riduzione del rischio di conversione a SMCD del 50%, mentre dopo 5 anni il rischio si riduceva al 46% (HR=0,54; 95% [CI]: 0,43-0,67; p<0,0001), prolungando l'intervallo di tempo tra il primo ed il secondo episodio di 16 mesi (p<0,003). Anche in questo caso nel gruppo trattato è stato evidenziato un miglioramento dei parametri di efficacia alla RM con una riduzione del carico lesionale, del numero delle nuove lesioni e delle lesioni Gd+ (*Kappos, 2009*).

Lo studio PreCISE, trial randomizzato e in doppio cieco, ha dimostrato in 481 pazienti con CIS, l'efficacia del Glatiramer Acetato nel ridurre il rischio di sviluppare una SMCD nel 45% dei casi (HR=0.55 95% [CI]: 0.40-0.77; p=0.0005), con un prolungamento, nel 25% dei pazienti, del tempo di conversione a SMCD del 115% (da 336 giorni a 722 per glatiramer acetato), (*Comi, 2009*).

Il razionale di una terapia precoce risiede nelle robuste evidenze indicanti che il danno assonale inizia già nelle fasi precoci della malattia (*Montalban, 2004*). Studi di RM, sia convenzionale, che con le nuove tecniche, hanno dimostrato che in alcuni pazienti l'atrofia cerebrale e il danno assonale iniziano già al primo episodio di malattia (*De Stefano, 2001*) e che il grado di atrofia cerebrale correla con il numero di lesioni infiammatorie alla RM (*Comi, 2001*). Questi dati sostengono l'ipotesi che il danno assonale sia il precursore della

degenerazione neuronale, a sua volta coinvolta nello sviluppo del deficit neurologico irreversibile.

Alla luce di queste evidenze, il trattamento precoce dovrebbe rallentare il danno assonale, ritardare la progressione della malattia ed intervenire prima del raggiungimento del punto di non ritorno, oltre il quale la riparazione del danno non è più possibile e la progressione della disabilità diviene inarrestabile.

Tuttavia, il riscontro clinico di una percentuale variabile di pazienti con decorso ‘benigno’ di SM, che non accumula invalidità significativa dopo 15-20 anni di malattia anche in assenza di trattamento, pone molti dubbi sull'applicazione con modalità estensiva dell'indicazione all'uso di terapie comunque non prive di effetti collaterali e costose. Di fronte alla possibilità che il decorso naturale della malattia possa essere ‘benigno’, la scelta terapeutica potrebbe prendere in considerazione una condotta di attesa. La questione del trattamento precoce acquista rilevanza ancora maggiore se si considerano i pazienti con CIS a rischio di conversione a SM. Di conseguenza, ancora oggi, le decisioni terapeutiche rimangono basate soprattutto sull'esperienza del singolo clinico, anziché su chiari criteri di prognosi.

Fattori predittivi di conversione a SM

La possibilità di stratificare i pazienti con CIS in gruppi ad alto o basso rischio di conversione a SM ha numerose implicazioni: sia per il paziente, che si trova ad affrontare l'incertezza del futuro, che per il medico che sarebbe così in grado di consigliare al meglio il paziente, soprattutto in merito alla possibilità di iniziare una terapia di prevenzione precoce. Infatti, l'attuale disponibilità di terapie in grado di modificare il decorso di malattia rende

indispensabile non solo una diagnosi di SM quanto più precoce ed accurata, ma anche migliori criteri di selezione dei pazienti più idonei a ricevere un determinato trattamento.

Oltre alle motivazioni di carattere psicologico e sociale, l'individuazione di marcatori di prognosi sarebbe anche di grande rilevanza per la pianificazione delle sperimentazioni terapeutiche poiché permetterebbe di includere nei *trial* clinici gruppi di pazienti più omogenei tra loro. Tuttavia, nonostante i numerosi studi eseguiti, a tutt'oggi nessun fattore prognostico è stato inequivocabilmente correlato all'evoluzione in SM.

I principali fattori con possibile valore prognostico si distinguono in:

- Fattori demografici e clinici: tra cui tipologia d'esordio di malattia, razza, sesso, età.
- Markers neuroradiologici: numero, tipologia e sede di lesioni alla RM.
- Fattori Biologici: tra cui presenza di anticorpi sierici o liquorali, quantità di proteine e cellule liquorali, presenza di bande oligoclonali IgG(IgGBO) ed IgM(IgMBO).

FATTORI DEMOGRAFICI E CLINICI

Razza, genere, età

La SM esordisce nel 70% dei casi tra i 20 ed i 40 anni (*Masson, 2008*), è più frequente negli individui di razza caucasica (*Noseworthy, 1999*) e di genere femminile: si stima che il 70% di tutti i pazienti con SM siano donne (*Duquette, 1992; Jacobs, 1999*). Il genere femminile è stato identificato da alcuni studi come fattore predittivo sfavorevole per la conversione a SM (*Swanton, 2010*), mentre un esordio in età più avanzata (*Nilsson, 2005*) e l'etnia non caucasica sembrano avere una valenza protettiva (*Mowry, 2009*).

Lo studio condotto da Mowry e coll. (2009), su una corte di 330 pazienti con SM/CIS, ha evidenziato un aumento del rischio di conversione da CIS a SM in presenza di determinati fattori clinici: l'etnia differente da quella caucasica (HR=2.39; 95% [CI]: 1.58-3.60, p<0.0001) e la giovane età (25-55 anni) (HR per ogni incremento di 10 anni: 1,51; 95% [CI]: 1,28-1,80, p<0,0001). Altri fattori clinici indagati in questo studio tra cui la gravità del primo evento demielinizzante, il genere, la sede della lesione, una RM positiva vs negativa ed un esordio multifocale non modificavano il rischio di avere un secondo evento di malattia.

Uno studio più recente (Swanton, 2010) effettuato su 143 pazienti con CIS, indica il genere femminile come fattore predittivo sfavorevole di conversione da CIS a SM (HR=2,1), mentre lo studio di Nilsson P (2005) suggerisce un rischio maggiore di conversione da CIS a SM nei pazienti con esordio di malattia in giovane età (range: 25-34 anni). Infine, uno studio più recente (Gout, 2010) ha riconfermato questi dati evidenziando come l'età (<31 anni) fosse associata ad un aumento del rischio di conversione a SM (HR=1,44; 95% [CI]:1,02-2,01).

Tipologia di esordio

La neurite ottica è stata ripetutamente associata in vari studi ad un rischio inferiore di conversione a SM (Confavreux, 2003, Weinshenker,1989; Weinshenker, 1994; Runmarker, 1993). Tuttavia, altrettanti studi prospettici e *trial* clinici eseguiti su pazienti con CIS hanno concluso che le variabili cliniche e neuroradiologiche, compresa la differente localizzazione delle lesioni, non hanno valenza prognostica (Brex, 2002; Morrissey, 1993; O'Riordan, 1998; Jacobs, 2000; Comi, 2001; Tintoré, 1999; Tintoré, 2003).

Il rischio di sviluppare una SMCD in pazienti con esordio acuto di Mielite Trasversa Parziale (*Acute Partial Transverse Myelitis*, APTM) e una RM cerebrale basale normale è stato

indagato da un recente studio (*Scott, 2010*): la APTM se associata ad una RM cerebrale normale presentava un bassa percentuale di conversione a SMCD.

FATTORI NEURORADIOLOGICI

Le tecniche di RM hanno migliorato notevolmente la nostra capacità di determinare una prognosi, fino a considerare la RM stessa uno dei principali fattori predittivi di conversione da CIS a SM (*Tintore' M, 2001; Tintoré M, 2005; Pelayo R, 2007; Pelayo R, 2010; Morrissey SP, 1993; O'Riordan JI, 1998; Brex PA 2002; Beck RW, 2004*).

Già molti studi hanno dimostrato che la positività alla RM cerebrale e spinale al primo evento demielinizzante (neurite ottica, mielopatia acuta, interessamento acuto del tronco cerebrale) aumenta il rischio di conversione a SM del 56-88% nei 2-5 anni successivi, mentre i pazienti che non presentano lesioni alla RM al momento del primo evento demielinizzante hanno un rischio di conversione inferiore (15-22%) (*Brex PA, 2002; Tintore M, 2006; Minneboo, 2004; Beck RW, 2003*). Lesioni Gd+ sono state associate ad un aumento del rischio di conversione a SM (*Barkhof F, 1997; Brex PA, 2001; Tas MW, 1995*); anche la presenza di nuove lesioni T2-pesate alla RM di controllo è stata correlata ad un aumento del rischio per un secondo episodio demielinizzante (*Brex PA, 2001; Morrissey SP, 1993; Brex PA, 1999*).

Inoltre, la presenza di lesioni demielinizzanti in determinate sedi del SNC (periventricolari, juxtacorticali, infratentoriali, midollo spinale), tipiche per la SM, può avere un ruolo predittivo per la conversione a SM (*Barkhof F, 1997; Tintoré, 2010*).

Tintoré et al (*2010*) hanno realizzato uno studio che ha evidenziato la presenza di uno stretto legame tra numero e sede delle lesioni osservate alla RM basale, e che questo legame era in grado di aumentare il rischio di conversione a SMCD, oltre che a maggior grado di disabilità.

Lo studio ha analizzato una corte di 246 pazienti con CIS seguiti per un tempo medio di 7,7 anni: 105 (42,7%) di questi pazienti avevano presentato conversione a SMCD durante il periodo di follow-up e, nei i pazienti con RM di base alterata, il rischio di conversione a SMCD era aumentato di 8,4 HR (95% [CI]: 4,2-16,7) rispetto a coloro con RM basale normale. Dividendo i pazienti in tre gruppi in base al numero di lesioni (n° lesioni=0,1< n° <8, n° >9), il rischio di conversione a SMCD aumentava nel secondo gruppo di 6,4 HR (95% [CI]: 2,7-14,9) fino a 10,7 HR (95% [CI]: 4,5-25,9) nel terzo gruppo.

Altri studi hanno evidenziato che il volume lesionale e le loro modificazioni (progressione o regressione) durante i primi 5 anni, più che essere associate ad un aumento del rischio di conversione da CIS a SM, sarebbero correlate al grado di disabilità nei 20 anni successivi (*Rovaris et al., 2003; Brex et al., 2002*).

Lo studio condotto da Swanton JK (2010) ha cercato di valutare il ruolo prognostico della RM, eseguita all'esordio, per la conversione da CIS a SM, in particolare analizzando l'influenza del numero, sede ed attività delle lesioni al momento dell'esordio di malattia, e la comparsa di nuove lesioni nel breve periodo di follow-up. Sono stati considerati 143 pazienti con CIS, dei quali l'80% presentava una RM basale positiva a livello cerebrale o del midollo spinale. Il 40% dei pazienti sviluppò una SMCD in un tempo medio di 16 mesi dal primo evento demielinizzante, di questi, solo il 10% non presentava lesioni alla RM basale, contro il 49% che presentava una o più lesioni. La presenza di una o più lesioni alla RM basale aumentava il rischio di conversione a SM di 7 volte (HR=7.04, 95% [C I]: 2.19-22.56, $p<0.001$) se confrontata con la RM basale normale. Inoltre un elevato numero di lesioni ($n^{\circ}>9$) presenti alla RM cerebrale T2 pesata aumentavano ulteriormente il rischio di 1,81 HR (95% [CI]: 1.40-2.34, $p<0.001$).

FATTORI BIOUMORALI

I fattori bioumorali che sono ricercati più comunemente nei pazienti con SM sono: anticorpi sierici o liquorali, quantità di proteine e cellule liquorali, presenza di bande oligoclonali IgG ed IgM. Questi fattori sono stati studiati nel tentativo di identificare una valenza predittiva nella conversione da CIS a SM. Comunque sempre maggiori sforzi sono finalizzati sia alla conferma degli attuali fattori biologici oltre che alla continua ricerca di nuovi.

Conta cellulare a livello del liquor

L'aumento del numero di cellule nel liquor sembra associato ad un maggiore rischio di conversione a SM in pazienti con CIS (*Tintoré, 2005, Gout O., 2010*).

In uno studio recente, Gout e coll. (2010) hanno valutato l'associazione tra fattori bioumorali a livello del liquor ed il rischio di conversione a SM in 208 pazienti con CIS, sottoposti ad una RM ed all'analisi del liquor al momento dell'esordio di malattia, con follow up di 3,5 anni. Durante il periodo di monitoraggio, il 68% dei pazienti ha presentato conversione a SMCD. L'analisi multivariata ha indicato che l'aumento della conta cellulare a livello del liquor (n° cellule >4 cell/mm³) era associato ad aumento del rischio di conversione a SM (HR=1,44; 95% [CI]: 1,03-2,02) e che questo rischio era indipendente da altri fattori.

Tuttavia ci sono pareri discordanti sull'importanza della conta cellulare, infatti secondo lo studio di Awad (2010) la conta cellulare è normale nei 2/3 dei pazienti con SM e la restante parte presenta solo una moderata pleiocitosi, con un numero di cellule che comunque rimane inferiore alle 50 cell/μl. (*Awad A, 2010*).

Bande Oligoclonali Liquorali IgG

Le bande oligoclonali liquorali IgG sono considerate da sempre il "marchio" della SM, anche se non dotate di assoluta specificità, essendo presenti nel 90-95% delle forme di SMCD (*Andersson M. et al., 1994*). Le IgGBO compaiono precocemente nel liquor, con un pattern

isoelettroforetico che rimane costante nel corso della malattia e non si modifica col trattamento. Seppure la maggiore rilevanza del riscontro delle IgGBO sia ai fini diagnostici, alcuni studi riportano un possibile valore prognostico (*Avasarala JR et al., 2001*). Infatti, la presenza delle IgGBO liquorali individuate precocemente nella malattia è stata associata con una prognosi sfavorevole (*Amato e Ponziani, 2000; Amato MP et al., 2006; Berger, 2003 J. Masjuan, 2006; Gout, 2010, Rojas, 2010*), mentre la loro assenza è stata associata ad un migliore decorso a lungo termine (*Zeman, 1996; Avasarala, 2001; Izquierdo, 2002*).

In particolare, l'assenza di bande oligoclonali IgG a livello del liquor è stata associata (*Amato MP et al., 2006*) ad una riduzione della disabilità, misurata con l'EDSS score, in pazienti con SM-RR ($p=0.012$). L'accumulo di disabilità a lungo termine era maggiore per i pazienti con IgGOB e correlato in modo proporzionale al numero di lesioni alla RM, suggerendo che l'assenza di IgGOB, oltre ad un ridotto numero di lesioni alla RM, siano fattori prognosticamente favorevoli.

Anche il gruppo di ricerca coordinato da Masjuan J. (*Masjuan J., 2006*), ha valutato la presenza delle IgGOB a livello del liquor e la positività alla RM come predittori della conversione da CIS a SM. In questo studio sono stati coinvolti 52 pazienti con CIS in cui è stata analizzata la presenza delle IgGOB e i risultati alla RM. La presenza delle IgGOB evidenziò una sensibilità del 91.4% ed una specificità del 94.1% nel predire la conversione da CIS a MS definita, mentre la positività alla RM determinava una sensibilità del 74.23% ed una specificità 88.2%. La combinazione simultanea dei due fattori prognostici mostrava una sensibilità del 97.1% ed una specificità del 88.2%. Un percorso analogo è stato seguito da altri autori (*Gout O., 2010*), che hanno ulteriormente dimostrato il ruolo statisticamente significativo della presenza delle IgGOB in pazienti con CIS nell'aumentare il rischio di conversione a SMCD.

Anche lo studio di tipo prospettico (*Rojas, 2010*) ha sottolineato il ruolo prognostico sfavorevole delle IgGOB. In questo studio sono stati arruolati, dal 1998 al 2006, pazienti con CIS sottoposti a RM cerebrale e ricerca delle IgGOB entro due mesi dal primo evento demielinizzante, valutando l'entità ed il tempo di conversione a SM in relazione alla presenza delle IgGOB e della RM positiva. Dei 40 pazienti inclusi nello studio, 15 (37%) svilupparono una SM e 14 di questi 15 pazienti (93.3%) presentavano una RM basale positiva (HR = 5.9; 95% CI 1.3–10.1, p= 0.01) e 13 (86.7%) avevano IgGOB nel liquor (HR=5.3; 95% CI 1.6-9.5; p=0.01). Il rischio di conversione per i pazienti che presentavano entrambi i predittori risultò significativamente più alto se comparati al gruppo di pazienti che erano negativi per entrambi o positivi solo per uno (HR = 9.1; 95% CI 3.5–14.6). Il tempo medio di conversione a SM fu di 6.8 ± 3.5 mesi per i pazienti con IgGOB e RM+ e di 19 ± 14 mesi per i pazienti che presentavano solo un fattore., confermando ancora una volta che i pazienti con CIS, positivi per IgGOB liquorali all'esordio di malattia presentavano un alto rischio di sviluppare la malattia conclamata e che la contemporanea presenza di questi due fattori riduceva il tempo di conversione.

CXCL13

Il crescente riconoscimento dell'importanza delle cellule B nell'immunopatogenesi della SM incoraggia la ricerca di biomarkers cellule B-correlati a livello del liquor. In particolare sembra rilevante la presenza del CXCL13, chemochina strettamente correlata alle cellule B, come fattore predittivo di conversione da CIS a SM.

CXCL13 è una potente citochina chemotattica in grado di influenzare la risposta B linfocitaria, inducendo la proliferazione, la differenziazione e la migrazione a livello del SNC dei linfociti B (*Reiber H, 2001; Torcia M., 1996*). I livelli di questa citochina risultano estremamente alti nei pazienti con SM, questo può essere spiegato dal ruolo

immunomodulante che questa citochina ricopre (Kuenz B., 2008). Infatti nei pazienti con SM è presente un aumento significativo della percentuale di cellule B-CD5+ che è strettamente correlato all'effetto immunomodulante del CXCL13. Le cellule B-CD5+ sono in grado di produrre IgM contro fosfatidilcolina (Fischer L., 2009) un lipide che costituisce il 12% dei lipidi totali della mielina (Brettschneider J., 2008), di conseguenza è probabile che le cellule B-CD5+, riconoscendo la fosfatidilcolina od altri lipidi mielinici, possano impostare una risposta anticorpale IgM persistente quando migrano a livello del SNC, come suggerisce il precoce rinvenimento di queste cellule a livello del liquor (Kuenz B., 2008).

In questi ultimi anni ci si è chiesti se i livelli di CXCL13 potessero avere un valore prognostico di conversione a SM nei pazienti con CIS.

In un recente studio (Khademi M., 2011) si è indagato il ruolo che questa citochina (CXCL13) poteva avere nel predire la conversione da CIS a SM, oltre a dare informazioni sul decorso di malattia. Lo studio fu eseguito su un gruppo eterogeneo di 837 pazienti (n°=79, CIS; n°=323, SMRR; n°=40, SMSP; n°=24, SMPP; n°=181, OND; n°=176, iONDS; n°=14, controllo) (*other neurological disease, OND; other neurological disease with signs of inflammation, iONDS*), in cui furono indagati i livelli di CXCL13 utilizzando il metodo ELISA.

I risultati ottenuti evidenziarono che i livelli di CXCL13 erano molto elevati nei pazienti iONDS rispetto a tutti gli altri gruppi ($p < 0,0001$), nei pazienti con SM se comparati al gruppo controllo ($p < 0,0001$), nel gruppo di pazienti con CIS ($p < 0,01$) e nei pazienti con CIS con successiva conversione a SMCD ($p < 0,0001$). Inoltre, i livelli di CXCL13 si sono dimostrati significativamente aumentati nei pazienti con CIS ($p < 0,001$) e SM ($p < 0,0001$) positivi per IgGOB liquorali se comparati rispettivamente ai gruppi CIS e SM negativi per IgGOB.

I risultati emersi hanno evidenziato che CXCL13 non è particolarmente specifica per la SM ma ha comunque un'elevata sensibilità, indicando che il dosaggio di questa citochina potrebbe essere utilizzato nella valutazione di questa malattia sia a fini prognostici che diagnostici.

Livelli elevati di CXCL13 sono stati riscontrati anche in associazione alla presenza di IgMOB liquorali, come risulta da uno studio di Villar e coll (2010), che hanno confrontato il profilo B linfocitario (CD5+) tra pazienti con SM positivi alle IgMOB-LS (bande oligoclonali IgM lipido-specifiche), pazienti con SM negativi alle IgMOB-LS e pazienti con altre malattie neurologiche infiammatorie.

Bande oligoclonali Liquorali IgM

Le bande oligoclonali IgM sono presenti nel 28-45% dei pazienti con SMCD (*Sharief, 1991; Sindic, 1994, Mandrioli, 2008, Sola, 2011*) e nel 20% circa dei pazienti con CIS (*Bosca, 2010*).

Diversi studi hanno dimostrato che la sintesi intratecale di IgM è fortemente associata ad un maggior rischio di conversione da CIS a SM (*Sharief, 1999; Villar, 2002a, Bosca 2010*) ad un decorso di malattia più aggressivo con un maggior numero di ricadute e maggior progressione di disabilità (*Sharief 1991; Villar et al. 2002b, 2003, 2005, 2008; Perini, 2006; Thangarajh et al., 2008; Mandrioli et al., 2008*), con un maggiore carico lesionale alla RM (T2-T1) e con la presenza di atrofia cerebrale centrale (*Jongen et al., 2007; Magraner MJ et al., 2010*).

Sintesi intratecale di IgM e conversione ad SM clinicamente definita

Alcuni studi hanno dimostrato che la presenza di IgMOB nel liquor è associata ad un maggiore rischio di conversione da CIS a SM (*Sharief, 1991; Villar, 2002a, 2005, Bosca*

2010a). Già nel 1991 Sharief e coll. (*Sharief et al., 1991a*), avevano identificato una correlazione tra presenza di sintesi intratecale di IgM e “attività di malattia”, intesa come minor lasso di tempo tra la rachicentesi e la prima ricaduta, evidenze confermate successivamente anche da Perini e coll. (2006).

Nell’ambito di uno studio prospettico (*Villar et al., 2002a*) si è evidenziato che nei pazienti affetti da CIS positivi per IgMOB liquorali, la probabilità di conversione a SM ad un anno era del 90%, mentre i pazienti negativi avevano presentato una seconda ricaduta in tempi molto più lunghi: il 51% dopo 36 mesi. In questo campione, le IgMOB erano presenti nel 40% dei 22 pazienti.

Lo stesso gruppo (*Villar et al, 2005*) ha successivamente studiato se le IgMOB liquorali di alcuni pazienti con SM fossero dirette contro antigeni non proteici della mielina, in particolare gli antigeni lipidici, e le possibili correlazioni tra questi anticorpi e il decorso della malattia. Nell’87% dei pazienti positivi per le IgMOB, gli anticorpi erano diretti contro antigeni lipidici specifici, tra i quali il più riconosciuto era la fosfatidilcolina, isolato o associato ad altri antigeni lipidici, mentre in un minor numero di pazienti le IgM erano dirette verso altri antigeni lipidici, quali sfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositolo. La presenza di anticorpi IgM diretti contro antigeni lipidici era stata tuttavia riportata nel 100% dei pazienti in cui la rachicentesi era stata eseguita al secondo episodio di malattia, mentre erano CIS tutti i casi in cui gli anticorpi diretti contro specifici antigeni lipidici erano assenti. Valutando poi la probabilità di rimanere liberi da nuovi attacchi dopo l’esordio di malattia, gli autori hanno osservato, che solo il 18% dei pazienti con IgMOB era libero da ricadute 5 anni dopo l’esordio, contro il 32% dei pazienti privi di IgMOB. La differenza aumentava drasticamente se si considerava la presenza o assenza di anticorpi IgM contro antigeni lipidici specifici: infatti, tutti i pazienti con anticorpi contro specifici antigeni lipidici avevano

presentato una seconda ricaduta 11 mesi dopo l'esordio, mentre il 36% dei pazienti privi di tali anticorpi non aveva presentato ricadute a 5 anni dall'esordio. Gli autori hanno concluso che la presenza di anticorpi diretti contro specifici antigeni lipidici aveva un forte valore predittivo di una seconda ricaduta e influenzava significativamente anche il numero di ricadute e la progressione di disabilità misurata con la scala EDSS.

Il ruolo prognostico sfavorevole delle IgMOB è stato ulteriormente dimostrato da un recente studio (*Boscá I., 2010a*), che ha analizzato il rischio di una seconda ricaduta in un gruppo di 192 pazienti con CIS, successivamente diviso in tre sottogruppi in base alla presenza o assenza di OB e seguito per un periodo di follow-up di 3 anni: pazienti OB- (25.7%); pazienti IgGOB+ (52,3%); pazienti con entrambe le IgGOB+IgMOB+ (22%). Il confronto statistico dei risultati ottenuti tra i diversi sottogruppi ha evidenziato un aumento pari a 9,3 volte del rischio nei pazienti IgGOB+ verso quelli IgGOB-, un aumento di 39,6 volte nel gruppo dei pazienti BO IgG+IgM+ vs il gruppo privo di BO, ed un aumento di 4.4 volte vs il gruppo con solo IgGOB. Inoltre, l'analisi del tempo medio necessario per una seconda ricaduta ha evidenziato importanti differenze tra i gruppi, in particolare il gruppo di pazienti IgGOB+IgMOB+ ha presentato un tempo medio per una seconda ricaduta di 0.7 anni contro i 3.3 anni del gruppo con le sole IgGOB+.

Tuttavia, alcuni studi non hanno confermato l'associazione tra sintesi intratecale di IgM e rischio di ricaduta dopo un primo evento demielinizzante del SNC. In particolare, uno studio retrospettivo tedesco (*Schneider R., 2007*) ha riportato la presenza di IgMOB nel 74% (31/42) di 42 pazienti con CIS, positivi per le IgGOB-, ma non ha evidenziato alcuna correlazione tra presenza di IgMOB e rischio di ricaduta durante un periodo di follow-up di 60 ± 25 mesi.

In un altro studio (*Stauch C., 2010*) condotto su 70 pazienti pediatriche con esordio di malattia avvenuto prima dei 16 anni, i pazienti furono divisi in due sottogruppi: gruppo di pazienti

IgMOB+ (n=44) e IgMOB- (n=26), seguiti per un periodo medio di 10,4 anni (range: 0,4-22,8 anni). I risultati di questo studio hanno evidenziato come il gruppo privo di IgMOB presentava una riduzione del tempo intercorso tra primo e secondo attacco di malattia che indica un maggiore rischio di conversione a SM (p=0,15), oltre ad un elevato numero di ricadute nel primo e secondo anno (p=0,04).

Tuttavia, occorre sottolineare i limiti dei suddetti studi: lo studio di Schneider è stato condotto raccogliendo i dati per il follow-up attraverso interviste telefoniche, con evidente elevato rischio di *recall bias*, mentre nello studio di Stauch, come fa notare Villar nel suo commento (Villar LM. e Alvarez-Cermeno JC, 2011), è stata utilizzata la formula di Reiber per determinare la sintesi intratecale di IgM anziché la ricerca della bande, che è considerato il metodo più sensibile e *gold standard* per la ricerca della sintesi intratecale di Ig (Kaiser R, 1993; Andersson M, 1994; Freedman SM, 2005).

Concludendo, nei pazienti affetti da SM la presenza di IgMOB liquorali, soprattutto se dirette contro i lipidi della mielina, sembra avere un valore prognostico sfavorevole, sia in termini di numero di ricadute, che di progressione di disabilità e, verosimilmente, in termini di precoce conversione da CIS ad SM.

OBIETTIVO

Con il presente studio si intende di determinare retrospettivamente il valore predittivo di conversione a SMCD, prendendo in considerazione fattori clinici, neuroradiologici e biologici (comprese le IgMOB liquorali) presenti all'esordio di malattia, in pazienti con CIS con un periodo di osservazione di almeno 3 anni.

MATERIALI e METODI

Selezione dei pazienti e raccolta dati

Abbiamo individuato dal database del Centro Sclerosi Multipla di Modena pazienti che avevano presentato un primo episodio demielinizzante tra il 1993 ed il marzo 2008. Di questi, abbiamo selezionato i pazienti con i seguenti criteri d'inclusione: follow-up di almeno 3 anni, esecuzione di RM encefalo all'esordio, esecuzione di puntura lombare a scopo diagnostico all'esordio di malattia, presenza di campioni biologici (liquor e siero) correttamente conservati a -80°C presso il laboratorio di Neuroimmunologia (per la ricerca di IgMOB). I criteri di esclusione applicati erano: dati clinici, neuroradiologici o di laboratorio incompleti o mancanti e presenza di un decorso progressivo sin dall'esordio.

Dei pazienti selezionati, abbiamo raccolto variabili di tipo demografico, clinico, laboratoristico e di RM al momento del primo evento demielinizzante, tra cui sesso, età all'esordio, sintomi all'esordio, EDSS all'esordio e EDSS dopo il recupero da ricaduta (minimo sei mesi), conta delle cellule e delle proteine al livello del liquor, Indice IgG di Link, presenza di bande oligoclonali IgG liquorali, informazioni relative alla RM cerebrale e spinale all'esordio e durante il follow-up, tra cui numero di lesioni T2-pesate, numero di

lesioni Gd+, sedi interessate dalle lesioni, tempo intercorso tra l'esordio e la diagnosi, tra l'esordio e la prima ricaduta, EDSS a tre anni ed all'ultima visita.

Non è stato necessario sottoporre il progetto al Comitato Etico poiché, al momento della riaccentesi diagnostica, tutti i pazienti avevano firmato un modulo di consenso informato alla procedura ed alla conservazione con eventuale futuro utilizzo a scopo di ricerca delle quote di liquor e siero che rimanevano dopo l'analisi diagnostica.

Procedure di Laboratorio

La determinazione delle IgMOB su siero e liquor conservati a -80°C è stata eseguita mediante isoelettrofocalizzazione (IEF) su gel d'agarosio con gradiente di pH, seguita da immunoblotting con anticorpi policlonali specifici contro le IgM umane (Dako, Denmark), modificando la metodica di Villar e coll. (*Villar LM et al., 2001*)

La lettura dei tracciati è stata eseguita in cieco da due neurologi (Dott.ssa Diana Ferraro e Dott.ssa Patrizia Sola) e da un biologo (Roberta Bedin), in caso di discrepanze.

Analisi statistiche

Abbiamo considerato come *outcome* per l'analisi di regressione logistica la conversione a SMCD entro 1,2 e 3 anni dall'esordio.

La diagnosi di SMCD si è basata su un secondo evento demielinizzante (ricaduta).

Il tempo necessario a determinare una conversione da CIS a SMCD è stato studiato attraverso un'analisi di sopravvivenza (curve di Kaplan-Meier) e le differenze tra i fattori di prognosi sono state valutate attraverso il test di Log-Rank.

È stato ulteriormente studiato l'impatto di ogni singolo fattore prognostico nell'influenzare la probabilità di sviluppo di SM/SMCD attraverso il modello di Cox.

Confronti tra gruppi sono stati effettuati tramite il test di Kolmogorov Smirnov applicato alle variabili continue.

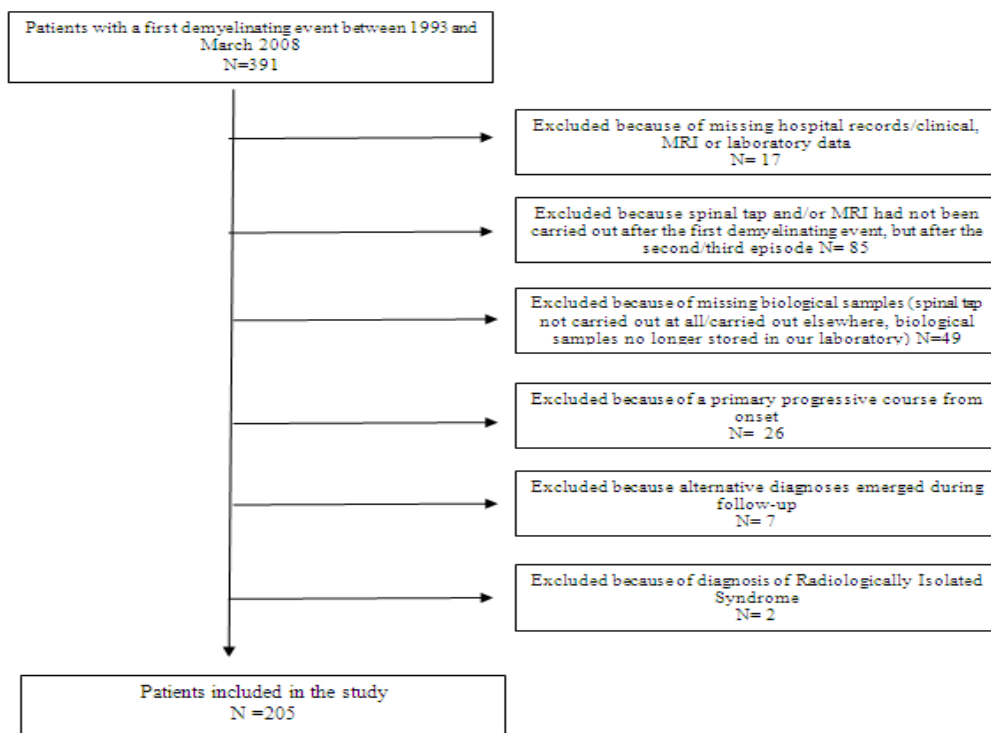
RISULTATI

Popolazione in esame

Abbiamo individuato 391 pazienti con un primo episodio demielinizzante tra il 1993 ed il marzo 2008 dal database del Centro Sclerosi Multipla. Abbiamo dovuto escluderne 186 per i motivi seguenti (vedi Tabella n°1):

- Dati clinici, di RM o di laboratorio mancanti o incompleti: 17 pazienti.
- Mancata esecuzione di puntura lombare e/o di RM al momento del primo episodio demielinizzante: 85 pazienti.
- Malattia primariamente progressiva fin dall'esordio: 26 pazienti.
- Errata diagnosi di CIS: 7 pazienti.
- Diagnosi di RIS (*Radiologically Isolated Syndromes*): 2 pazienti.

Tabella n°1. Selezione dei pazienti e motivi di esclusione.



L'analisi finale è stata quindi condotta su 205 pazienti, le cui caratteristiche cliniche e demografiche basali sono riassunte nella Tabella n° 2.

In breve, dei 205 pazienti selezionati (61M, 144F, età media: 32 +/- 9 anni), 55 (27%) hanno presentato un ricaduta entro un anno, 90 (44%) entro due anni, 112 (55%) entro 3 anni e 152 (74%) entro il termine del periodo di follow-up (durata media: 102 +/- 52 mesi).

Altri 34 pazienti (17%) hanno presentato un solo episodio clinico ma la diagnosi di SM è stata formulata sulla base dei criteri di disseminazione spaziale e temporale ad una RM successiva (Polman, 2011).

La RM basale era positiva (almeno una iperintensità nelle sequenze T2-pesate della sostanza bianca) in 186 (91%) pazienti; vi era una lieve pleiocitosi in 113 (59%), 175 (85%) avevano bande oligoclonali liquorali IgG e 40 (20%) bande oligoclonali liquorali IgM.

Tabella 1

Caratteristiche demografiche, cliniche, neuroradiologiche e liquorali dei pazienti con CIS all'esordio

Variabile	N° pazienti/Totale
Sesso	
M, n(%)	61/205(30)
F, n(%)	144/205(70)
Età all'esordio, media*	32 ± 9/205
Sintomi all'esordio	
Neurite Ottica, n(%)	52/205(25)
Sensitivo, n(%)	44/205(21)
Motorio/sensori-motorio, n(%)	35/205(17)
Tronco/cervelletto, n(%)	62/205(30)
Altro, n(%)	12/205(6)
Esordio spinale	
Sì, n(%)	62/204(30)
No, n(%)	142/204(70)
Esordio multifocale, n(%)	4/205(2)
EDSS all'esordio*	2.1 ± 0.8/194
Recupero completo, n(%)	153/194(77)
RM encefalo basale	
pos, n(%)	186/205(91)

neg, n(%)	19/205(9)
RM encefalo basale	
0 lesioni, n(%)	19/205(9)
1-2 lesioni, n(%)	29/205(14)
>2 lesioni, n(%)	157/205 (77)
RM encefalo basale: lesioni sottotentoriali, n(%)	96/205(47%)
RM encefalo basale: lesioni ∞ Gd+, n(%)	54/167(32)
Numero lesioni encefaliche ∞ Gd+, n(%)	
1-3, n(%)	113/167(68)
>3, n(%)	49/167(27)
	5/167(5)
RM midollo basale	
pos, n(%)	75/97(77)
neg, n(%)	22/97(23)
Numero lesioni midollari ∞ Gd+	
0, n(%)	58/97(59)
1, n(%)	38/97(39)
2, n(%)	2/97(2)
Proteine liquorali (g/dl) *(range)	38 \pm 13 (16-80)/194
Albumina siero/liquor* (range)	4.1 \pm 1.7 (1-11.4)/201
Link index* (range)	1.3 \pm 1.3 (0.3-16.2)/203
Pazienti con IgGOB liquorali, n (%)	175/205(85)

Pazienti con IgMOB liquorali, n (%)	40/205(20)
Conta cellule liquor (normale<4) *	7.7 ± 10 (0-80)/190
Pazienti con conta cellular aumentata, n (%)	113/190(59)

* Media ± deviazione standard

∞ Gd+= lesioni gadolinio-positive

I dati al termine del periodo di follow-up, durato 102 ± 52 mesi (range: 30-211), sono riassunti nella Tabella n°3. Entro la fine del periodo di follow-up il 91% dei pazienti coinvolti nello studio presentava una diagnosi di malattia mentre il 74% aveva presentato una ricaduta (diagnosi di SMCD).

Tabella 3

Dati clinici al termine del periodo di osservazione

Variabile	N° pazienti/Totale
Diagnosi al termine del periodo di osservazione, n(%)	
CIS	19/205(9)
MS: CIS + DIS and DIT§	34/205 (17)
SM clinicamente definita (SMCD)	152/205 (74)
Diagnosi di SMCD a un anno, n(%)	55/205(27)
Diagnosi di SMCD a due anni, n(%)	90/205(44)
Diagnosi di SMCD a tre anni, n(%)	112/205(55)
Tempo tra esordio a ricaduta, mesi* (range)	30 ± 29 (1-130)/152
EDSS a tre anni* (range)	1.2 ± 1 (0-5.5)/191
EDSS all'ultima visita* (range)	1.9 ± 1.6 (0-7)/205

§ DIS and DIT: disseminazione nello spazio e nel tempo

* Media ± deviazione standard

Analisi statistiche

I risultati dell'analisi di regressione logistica univariata hanno evidenziato che i fattori associati ad un aumento del rischio di conversione a SMCD entro 3 anni sono: età inferiore (<30 anni) all'esordio (p<0.001; OR: 2.8, 95%CI: 1.6-5) e conta cellulare liquorale aumentata (>4 cellule/mm³) (p=0.039; OR: 1.9, 95%CI: 1.3-3). Fattori associati a rischio aumentato di conversione a SMCD entro 2 anni sono: età inferiore (<30 anni) all'esordio (p<0.001; OR:

2.8, 95%CI: 1.6-5), conta cellulare liquorale aumentata ($p<0.032$; OR: 1.9, 95%CI: 1.1-3.5) e un esordio con neurite ottica ($p=0.048$; OR:1.9, 95%CI: 1.3-6), mentre un esordio con sintomi spinali ne riduce il rischio ($p=0.025$; OR:0.5, 95%CI: 0.3-0.9).

Il rischio di ricadute entro un anno (tabella 4) è aumentato solo dalla presenza di IgMOB liquorali ($p=0.014$; OR: 2.5, 95%CI:1.2-5.1).

Tabella 4

Associazione tra fattori prognostici e diagnosi di Sclerosi Multipla Clinicamente Definita a un anno.

Variabile	N°	N° eventi (%)	OR	95%CI	p
<i>Demografica</i>					
Sesso			M/F		
M	61	12(20)	0.58	0.3-1.2	0.135
F	144	43(30)			
Età			$\leq 30 / > 30$		
≤ 30	94	30(32)	1.6	0.9-3	0.132
> 30	111	25(23)			
<i>Dati di Laboratorio</i>					
IgG OB liquorali			Presenti/Assenti		
Presentii	175	46(27)	0.8	0.4-2	0.672
Assenti	30	9(30)			
IgM OB liquorali			Presenti/Assenti		

Presenti	40	17(43)	2.5	1.2-5	0.014
Assenti	165	38(23)			
Conta cellulare liquor			Elevata/Normale		
Elevata (>4mmc)	113	33(29)	1.3	0.7-2.4	0.492
Normale	77	19(25)			
<i>Dati clinici</i>					
EDSS all'esordio			>3/<=3		
>3	60	18(30)	1.2	0.6-2.3	0.653
<=3	134	36(27)			
Sintomi all'esordio			NO/Altro		
Neurite Ottica (NO)	52	17(33)	1.5	0.7-2.9	0.271
Altro	153	38(25)			
Esordio spinale			Sì/no		
Sì	62	13(21)	0.6	0.3-1.3	0.205
No	142	42(30)			
Recupero completo			No/Sì		
No	45	17(38)	1.9	1-4	0.060
Sì	153	36(24)			
<i>Dati di RM</i>					
RM encefalo			Pos/neg		

Postitiva	186	51(27)	1.4	0.4-4.5	0.552
Negativa	19	4(21)			
RM encefalo					
0 lesioni	19	4(22)	Riferimento		
1-2 lesioni	29	11(38)	2.29	0.6-8.7	0.223
>2 lesioni	157	40(26)	1.3	0.4-4.1	0.675
Lesioni sottotensoriali					
Sì	96	28(26)	1.1	0.6-2.1	0.694
No	109	27(28)			
Lesioni encefaliche *Gd+					
Sì	54	15(28)	1.1	0.5-2.2	0.867
No	113	30(27)			
N° lesioni *Gd+					
0	113	29(25)	Riferimento		
1-3	50	14(28)	1.1	0.5-2.4	0.724
>3	5	1(20)	0.7	0.1-6.7	0.769
RM spinale			Pos/neg		
Positiva	75	22(29)		0.7-9.8	0.150
Negativa	22	3(14)	2.6		

RM spinale: *Gd+					
Sì	40	9(23)	0.6	0.3-1.6	0.354
No	57	18(32)			

*Gd+=lesioni gadolinio-positive

Analisi di sopravvivenza

I risultati dell'analisi di sopravvivenza univariata hanno evidenziato come fattori prognostici associati ad un aumento del rischio di conversione a SMCD (tabella 5): età inferiore all'esordio ($p < 0.001$; HR: 2.2, 95%CI: 1.5-3 per età <30 anni), esordio con neurite ottica ($p = 0.021$; HR: 1.5, 95%CI: 1.1-2.2) e la presenza di IgMOB liquorali ($p = 0.043$; HR: 1.5, 95%CI: 1-2.2).

Tabella 5

Impatto dei fattori prognostici sulla probabilità di conversione a Sclerosi Multipla Clinicamente Definita durante il period di osservazione.

Variabile	N°	N° eventi (%)	Periodo follow-up (mesi)	Tasso	HR	95%CI	p	Log-rank
<i>Demografica</i>								
Sesso					M/F			
M	61	45(74)	2740	0.02	0.9	0.6-1.2	0.394	0.388
F	144	106(74)	5572	0.016				

Età					<=30/>30			
<=30	94	84(89)	2991	0.028	2.2	1.6-3	0.000	0.000
>30	111	68(61)	5321	0.013				
<i>Dati Laboratorio</i>								
IgGOB liquorali					Pres./Assenti			
Presenti	175	131(75)	7046	0.016	1.2	0.7-1.9	0.451	0.446
Assenti	30	20(67)	1266	0.019				
IgMOB liquorali					Pres./Assenti			
Presenti	40	33(83)	1266	0.026	1.5	1-2.2	0.043	0.04
Assenti	165	118(72)	7046	0.017				
Conta cell.					Elev./normale			
Elevata (>4)	113	88(78)	4030	0.022	1.3	1-1.9	0.090	0.085
Normale	77	53(69)	3364	0.016				
<i>Dati clinici</i>								
EDSS all'esordio					>3/<=3			
>3	60	40(67)	2426	0.0160	0.9	0.6-1.3	0.622	0.619
<=3	134	101(75)	5395	.019				

Esordio					NO/Altra			
Neurite	52	43(83)	1647	0.026	1.5	1.1-2.1	0.024	0.02
Ottica	153	108(71)	6665	0.016				
Altro								
Esordio spinale	62	41(66)	2741	0.015	Sì/No	0.5-1.1	0.109	0.105
Sì	142	110(78)	5517	0.02	0.7			
No								
Recupero					No/Sì			
No	45	33(73)	1382	0.0240	1.3	0.9-2	0.160	0.155
Sì	153	111(73)	6617	.017				
<i>Dati RM</i>								
RM encefalo	186	140(75)	7421	0.0190	Pos/neg	0.8-2.8	0.192	0.183
Positiva	19	11(58)	891	.012	1.5			
Negativa								
Lesioni sottotent.					Sì/no			
Sì	96	71(73)	3678	0.019	1.1	0.8-1.6	0.465	0.460
No	109	81(74)	4634	0.017				

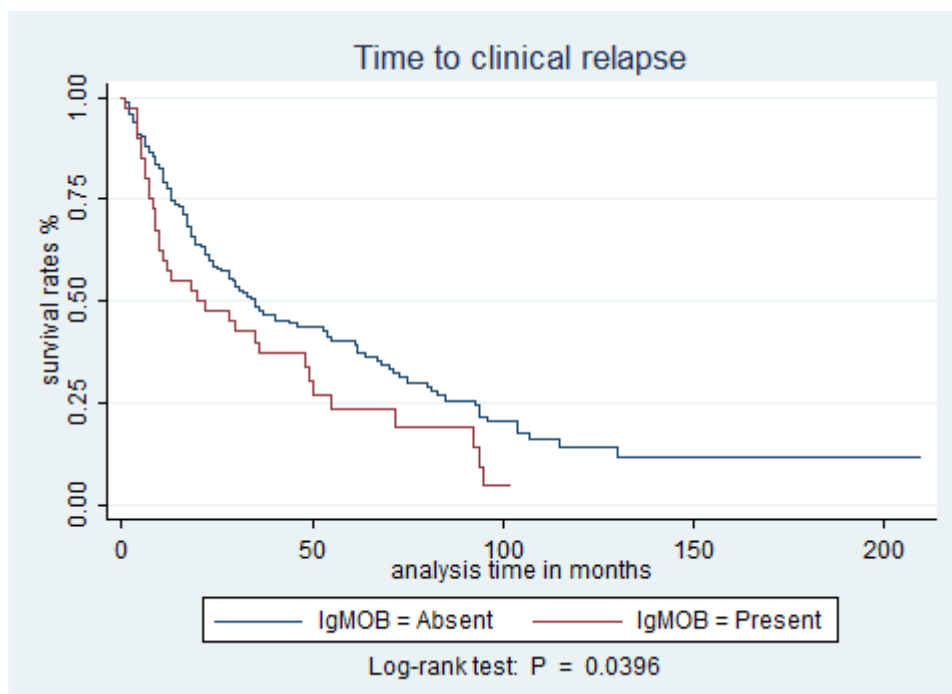
Encefalo:					Sì/no			
*Gd+	54	40(74)	2382	0.017	1	0.7-1.5	0.804	0.802
Sì	113	77(68)	4440	0.017				
No								
RM spinale					Pos/neg			
Positive	75	49(65)	2914	0.0170	1.1	0.6-2.1	0.731	0.729
Negative	22	13(59)	841	.015				
RM spinale:					Sì/no			
*Gd+	40	25(63)	1825	0.014	0.7	0.4-1.2	0.242	0.237
Sì	57	37(65)	1873	0.02				
No								

*Gd+=lesioni gadolinio-positivo

Il tempo mediano alla ricaduta era di 35 mesi per pazienti IgMOB-negativi e di 20 mesi per i pazienti IgMOB-positivi. Se consideriamo i pazienti IgMOB-negativi con esordio a più di 30 anni di età, il tempo mediano alla ricaduta aumenta a 68 mesi, mentre scende a 12 mesi se consideriamo pazienti IgMOB-positivi con esordio a meno di 30 anni di età. A 12 mesi il tasso di sopravvivenze è del 77% (95%CI: 70-82) in pazienti IgMOB-negativi e del 57% (95%CI: 41-71) in pazienti IgMOB-positivi.

La Figura 1 mostra la curva di sopravvivenza dei pazienti IgMOB-positivi verso i pazienti IgMOB-negativi (log-rank test; p=0.04).

Figura 1



Confronti tra gruppi

L'EDSS a 3 anni ed all'ultima visita era significativamente più elevate in coloro che avevano avuto una ricaduta entro una nno dall'esordio (1.5 ± 1.2 vs 1.1 ± 0.9 , $p=0.04$ and 2.4 ± 1.7 vs 1.7 ± 1.5 , $p=0.004$, rispettivamente).

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare retrospettivamente il valore predittivo di conversione a SMCD di fattori, clinici, neuroradiologici e biologici, compresa la presenza di IgMOB liquorali, presenti all'esordio di malattia, in pazienti con CIS con un periodo di osservazione di almeno 3 anni

Popolazione di studio

I dati clinici della nostra popolazione CIS, composta da 205 pazienti, sono paragonabili a quelli presenti in letteratura. In particolare, è noto dalla letteratura (*Compston A. & Coles A, 2008; Duquett et al 1992; Jacobs et al 1999; Confavreux, C., 1980, 2003*) che la SM esordisce nel 70% dei casi tra i 20 e i 40 anni e che il 70% dei pazienti con SM sono donne, con rapporto tra sessi di 2:1. Le tipologie di esordio più frequenti sono: neurite ottica (30-35%), sintomi da compromissione del tronco cerebrale (20-25%) e mielite trasversa (20%), con l'80% dei pazienti che recuperano completamente il deficit neurologico dopo il primo attacco demielinizzante. I pazienti arruolati nel nostro studio sono stati 205, di cui 144 (70%) femmine e 61(30%) maschi (rapporto 2,3:1), con età media di 39 anni \pm 9. Le tipologie di esordio che abbiamo identificato sono state: neurite ottica (25%), sintomi da coinvolgimento del tronco cerebrale (30%) e mielite trasversa (30%), con un recupero completo dopo il primo attacco demielinizzante nel 77% dei pazienti.

La percentuale di diagnosi di SM nei pazienti esaminati, dopo follow up di 3 anni secondo i criteri di McDonald (2005) è stata del 74%, con un tempo medio alla diagnosi di 24 \pm 27 mesi. La diagnosi di SMCD, in base ad un secondo attacco di malattia, si è verificata nel 55% dei pazienti, in accord con precedenti dati di letteratura, dai quali emerge che la percentuale di pazienti con CIS che converte a SMCD oscilla tra il 50-60% entro i 3 anni (*Jacobs LM,*

2000; Nilsson P, 2005), con una mediana temporale tra esordio e diagnosi di 16 mesi. Al contrario, altri studi non direttamente paragonabili al nostro per la diversa durata del follow-up, mostrano una percentuale di conversione a SMCD tra il 45 ed il 72% a 5 anni (Confavreux, 2006; Tintoré, 2004; Morrissey, 1993), oppure del 45% a due anni (Kappos, 2000).

Vi è una certa variabilità anche per quanto riguarda le percentuali di conversione a SM secondo i criteri di McDonald (2005), che variano dal 70% a 5 anni (Tintoré, 2006), all'85% a due anni (Kappos, 2000). Uno studio con un follow-up più lungo (Brex, 2000) evidenzia percentuali di conversione del 68% a 14 anni. Nel nostro caso, al termine del follow-up, durato in media 102 mesi (+/- 52), la percentuale di conversione a SMCD è stata del 74%.

Per quanto riguarda il grado di disabilità nella nostra popolazione, l'EDSS a 3 anni dall'esordio è inferiore o pari a 3 nel 95,81% della popolazione, dato paragonabile con altri studi, in cui la maggiore parte dei pazienti (90%) presenta a 3 anni un EDSS ≤ 3 (Tintoré 2006; Compston A. & Coles A, 2008).

La proporzione di pazienti con IgGOB liquorali (85%) è paragonabile a quella osservata in altri studi (72-85%)(Kappos et al., 2006; Comi et al., 2001; Gout et al., 2011), seppure al limite superiore.

Abbiamo osservato una percentuale maggiore di pazienti con RM encefalo positiva all'esordio: 91% vs 50-80% (Frohman EM, 2003). Ciò è probabilmente collegato ad una proporzione maggiore di pazienti con neurite ottica con RM positiva nella nostra coorte rispetto ai dati di letteratura: 88% vs 51% (Optic Neuritis Study Group, 2008). Occorre pertanto porre cautela nell'interpretazione dei dati riguardanti il ruolo prognostico dell'esordio con neurite ottica (che incrementerebbe il rischio di una ricaduta), poiché

potremmo, involontariamente, avere selezionato pazienti con un rischio maggiore di ricaduta. Tale “bias” di selezione potrebbe, per esempio, essere dovuto al mancato invio dei pazienti al nostro centro da parte degli oculisti nel caso di una RM encefalo basale negativa.

Fattori predittivi di conversione a SMCD

Nel presente studio i fattori prognostici associati ad un aumentato rischio di conversione a SMCD sono stati: età inferiore all'esordio (<30 anni), esordio con neurite ottica e presenza di IgMOB liquorali, mentre un esordio spinale è risultato protettivo. Il rischio di ricadute precoci (entro un anno) è stato aumentato solo dalla presenza di IgMOB liquorali.

Studi precedenti hanno documentato risultati simili per quanto riguarda l'incremento del rischio di ricadute in pazienti con età inferiore all'esordio (*Mowry et al., 2009; C. Polman et al., 2008; Gout et al., 2011*).

L'esordio con neurite ottica, storicamente, è stato associato ad una prognosi migliore, ma studi prospettici ci coorte su pazienti con CIS (*Brex et al., 2002; Morrissey et al., 1993; O'Riordan et al., 1998; Fisniku et al., 2008*) non riportano differenze nei tassi di conversione a SM o nella disabilità a lungo termine nei pazienti con topografie di CIS differenti ed i dati dal gruppo placebo dei trial clinici (*Jacobs et al., 2000*) non mostrano differenze nel tasso di conversione a SMCD a due anni nei diversi gruppi di CIS. In un lavoro prospettico longitudinale della durata di 20 anni su 107 pazienti CIS (*Fisniku et.al., 2008*), la disabilità nei pazienti esorditi con neurite ottica non era significativamente diversa da quella degli altri gruppi ed il tasso di conversione era elevato (67%). *Tintoré et al (Tintoré et al., 2005)* hanno prospetticamente valutato 320 pazienti con CIS e, considerando pazienti con neurite ottica e RM positiva, non differiscono da altri pazienti CIS rispetto al rischio di conversione clinica o neuroradiologica a SM. Gli autori concludono che è lo status della RM all'esordio, piuttosto

che la topografia dell'evento demielinizzante, a determinare il rischio di conversione. Nel nostro campione una elevata proporzione di pazienti con neurite ottica (88% vs 91.5% di pazienti con altri tipi di CIS) avevano RM positive all'esordio. Tale proporzione è simile a quella osservata da Swanton et al (77%) nel Regno Unito, che suggerisce che un'elevata prealenza di anomalie alla RM, e quindi un elevato rischio di conversione a SM in pazienti con neurite ottica, è legato all'elevata prevalenza geografica della SM (Swanton et al., 2006).

Il dato sulla riduzione del rischio di ricaduta in pazienti con esordio spinale potrebbe essere spiegata dalla prevalenza minore di anomalie alla RM encefalo basale in tale gruppo di pazienti (79% vs 96%); infatti, pazienti con esordio spinale sono noti avere tassi di conversione simili a quelli di altri pazienti CIS dove il rischio è incrementato dalla presenza di una positività della RM encefalica basale (Ruet et al., 2011).

Nella nostra coorte, solo la presenza di IgMOB liquorali è risultata predittiva di una seconda ricaduta entro un anno. Tali risultati sono simili a quelli riscontrati nello studio di Boscà et al (Boscà et al., 2010) su 192 pazienti con CIS seguiti per un tempo medio di 6 anni. Durante tale periodo i pazienti con IgMOB dirette contro antigeni lipidici avevano ricadute più precoci (intervallo mediano: 0.7 anni) rispetto a pazienti che ne erano privi (intervallo mediano: 3.3 anni) e rispetto a pazienti negativi sia per IgGOB che per IgMOB liquorali (intervallo mediano: 9.9 anni), con un rischio di 39.6 volte di avere una ricaduta nel gruppo IgGOB e IgMOB-positivo. Gli autori suggeriscono che pazienti con positività per IgMOB dirette contro i lipidi siano buoni candidati per l'inizio di una terapia immunomodulante precoce (García-Barragán et al., 2009), dato che l'intervento terapeutico è risultato efficace nell'interrompere la progressione di EDSS che i pazienti con positività per IgMOB liquorali avevano presentato prima di iniziare la terapia.

Vi sono anche crescenti evidenze di una maggiore progressione di disabilità nei pazienti con positività per IgMOB/IgMOB dirette contro i lipidi (*Villar et al., 2002a; Villar et al., 2002; Villar et al., 2003; L. Villar et al., 2008; Thangarajh et al., 2008; Sola et al., 2011; Mandrioli et al., 2008; Perini et al., 2006*) e di un maggiore aumento del carico lesionale alla RM (*Magraner et al., 2012; Jongen et al., 2007*). E' stata inoltre recentemente riportata una correlazione tra sintesi intratecale di IgM, numero di lesioni Gd+ alla RM e successivo aumento del carico lesionale (*Durante et al., 2011*).

IgM e patogenesi del danno alla mielina

Il motivo per cui la presenza delle IgMOB è correlata ad un peggiore decorso di malattia, è da ricercare nell'elevata efficienza delle IgM nel fissare il complemento (*Schroeder HW e Cavacini L, 2010*), potendo così determinare una demielinizzazione ed un danno assonale più esteso e severo (*Mead et al., 2002*).

Le IgM sono gli anticorpi prodotti più precocemente nella risposta immunitaria e la loro presenza nel liquor indica la presenza di cloni linfocitari attivati da stimolazioni antigeniche recenti nel SNC. Sono le prime Ig a ritornare a valori normali e la loro persistenza è considerata un segno di continua stimolazione antigenica (*Correale J. et al., 2002; SJH et al., 1993; Mead RJ et al., 2002*).

Nel 2001, Villar e collaboratori pubblicarono un metodo di isoelettrofocusing ad alta risoluzione per l'identificazione di IgM oligoclonali nel fluido cerebrospinale e nel siero di pazienti con SM, in grado di rilevare 0,1 ng in 5 microlitri di campione (*Villar LM. et al., 2001*). E' noto da studi immunoistochimici e molecolari, che gli anticorpi sono implicati nell'iniziale sviluppo della placca di demielinizzazione (*Gay et al., 1997; Barnett, 2004; Genain et al., 1999*) e che la deposizione di Ig co-localizza con frammenti attivi del

complemento ai bordi attivi delle lesioni (*Gay et al., 1997; Storch et al., 1998; Lucchinetti et al., 2000*). In particolare, le IgM, grazie alla loro struttura pentamerica, sono le Ig più efficienti nella fissazione del complemento ed è stato dimostrato che il complemento causa demielinizzazione associata a danno assonale (*Piddlesden et al., 1993; Mead et al., 2002*). Inoltre, la sintesi intratecale di IgM (ma non di IgG o IgA) è correlata alla sintesi 'de novo' intratecale della frazione C3 del complemento (*Sellebjerg, 1998*) e ad un aumento della concentrazione liquorale della proteina basica della mielina, che rappresenta un indice di demielinizzazione (*Frequin, 1992*).

Nella SM solo la sintesi intratecale di IgM correla con l'attivazione del complemento (*Sellebjerg 1998*) ed il ruolo del complemento e degli anticorpi nella demielinizzazione e nel danno assonale è stato chiaramente dimostrato (*Mead 2002*).

Le IgM si localizzano insieme al complemento nelle lesioni dei pazienti con neuromielite ottica di Devic, patologia che mostra un alto grado di demielinizzazione necrotizzante (*Lucchinetti et al., 2002*): questo potrebbe indicare che gli anticorpi IgM possono avere un ruolo nella SM simile a quello osservato nella neuromielite ottica e che la loro presenza potrebbe predire una demielinizzazione più aggressiva e quindi un peggior decorso di malattia.

Un altro dato interessante emerso da uno studio di Villar e coll. (2005) è il riscontro di un numero di linfociti B-CD5+ significativamente maggiore nei pazienti con IgMOB rispetto a quelli privi di IgMOB, in assenza di differenze statisticamente significative per i linfociti B-CD5-. Le cellule B-CD5+ sono tipicamente caratterizzate dall'essere effettrici di una risposta IgM sostenuta nel tempo, diretta verso antigeni naturali, cioè strutture filogeneticamente conservate. Tali cellule B tendono ad essere autoreattive (*Berland et al., 2002*), sono state implicate nella patogenesi dell'autoimmunità (*Rothstein et al., 2002*) e sono responsabili

della produzione di anticorpi naturali, che sono di solito isotipi IgM diretti contro antigeni non proteici (*Berland, 2002; Boes, 2000*). Il ruolo di questa sottopopolazione di linfociti B nella SM (CD5+) è stato già in precedenza riportato in due studi (*Bongioanni et al, 1996; Mix et al., 1990*), in cui si riscontrava una maggiore percentuale di tale popolazione di linfociti in pazienti con SM, in particolare nelle forme più aggressive di malattia, rispetto a pazienti affetti da altre patologie neurologiche (*Bongioanni, 1996*).

E' stato proposto dal gruppo di Villar e coll. (*2005*) che le IgMOB nella SM possano essere anticorpi 'naturali' secreti da cellule B-CD5+, che avrebbero perso l'espressione del CD20, indicando un fenotipo caratteristico di cellule B differenziate in grado di secernere una quantità maggiore di Ig (*Jensen 1989*).

Infine, in alcuni modelli sperimentali, le IgM contro lipidi della mielina, ma non le IgG, inducono la demielinizzazione del SNC e impediscono la rimielinizzazione (*Rosenbluth et al., 2003*), suggerendo che gli anticorpi IgM contro specifici antigeni lipidici della mielina potrebbero essere importanti nella fisiopatologia della malattia ed in particolare potrebbero esacerbarla, inducendo l'attivazione del complemento e la demielinizzazione complemento-mediata e accentuando la fagocitosi mielinica ad opera dei macrofagi e della microglia attraverso i recettori del complemento e del frammento Fc delle Ig. Questa cascata di eventi può favorire la presentazione dell'antigene mielinico proteico nel contesto di molecole MHC di classe II e di antigeni lipidici mielinici nel contesto delle molecole CD1. Attraverso questi meccanismi le IgMOB dirette verso specifici antigeni lipidici della mielina possono collaborare all'espansione della reazione infiammatoria che si verifica nelle lesioni della SM, contribuendo allo sviluppo delle lesioni stesse. Quindi le IgMOB liquorali nella SM sembrano avere un valore prognostico sfavorevole che riflette un attacco immuno-mediato

più severo contro mielina e assoni, il cui effetto ultimo si manifesta in una maggiore disabilità.

Sintesi intratecale di IgM e disabilità

Diversi studi hanno dimostrato che la sintesi intratecale di IgM è associata ad un decorso di malattia più aggressivo, con maggiore numero di ricadute e maggiore progressione di disabilità (*Sharief et al., 1991; Villar et al., 2002b, 2003, 2005, 2008; Perini et al., 2006; Mandrioli et al. 2008; Thangarajh et al., 2008*), oltre ad aumento del carico lesionale alla RM (T2-T1) ed alla presenza di atrofia cerebrale (*Jongen, 2007, Magraner MJ et al., 2010*).

Il ruolo prognostico sfavorevole delle IgMOB era già stato suggerito nel 1991 da Sharief e coll. (*1991*), che hanno trovato una correlazione tra presenza di sintesi intratecale di IgM, e “attività di malattia”, intesa come minor lasso di tempo tra la rachicentesi e la prima ricaduta ed il numero totale di ricadute. La sintesi intratecale di IgM era stata riscontrata nel 55% del loro campione di 150 pazienti. Successivamente, alcuni ricercatori spagnoli hanno documentato una associazione tra la presenza di sintesi intratecale di IgM, riscontrata in 30/65 pazienti, ed un grado maggiore di disabilità all'EDSS (*Villar et al., 2002b*).

Uno studio successivo (*Villar LM. et al., 2003*), ha evidenziato che dopo 10 anni di malattia, tutti i pazienti privi di IgMOB (18/29) avevano un decorso benigno, mentre la maggior parte dei pazienti con IgMOB (11/29) avevano un decorso più severo. Nessun paziente senza IgMOB aveva presentato una conversione verso una forma secondariamente progressiva e l'EDSS si era mantenuto <3 durante il follow-up (5-16 anni). Al contrario, tutti i pazienti con forma non benigna di SM erano positivi per IgMOB all'esordio ed il 70% di essi aveva sviluppato una forma secondariamente progressiva di malattia nell'arco dei 16 anni di follow-up.

Il ruolo prognostico sfavorevole delle IgM è stato confermato poi anche da altri gruppi di ricerca, con studi di tipo quantitativo: Perini e coll. (2006) hanno evidenziato che la sintesi intratecale di IgM correla con la disabilità dopo 15 anni di malattia (misurata tramite l'EDSS) e che vi è una correlazione inversa tra l'IgM index (IgM liquorali/IgM sieriche/albumina liquorale/albumina sierica) e l'intervallo prima di una ricaduta. Gli stessi autori hanno anche evidenziato che un IgM index più basso al momento dell'esordio clinico era correlato ad una progressione più lenta di malattia nell'arco dei successivi 15 anni. Al termine dello studio il 63,6% dei pazienti con IgMOB aveva raggiunto un EDSS pari a 6, nessuno dei pazienti senza IgMOB aveva un EDSS>3.

Inoltre, Jongen e coll. (Jongen et al., 2007), hanno riscontrato una correlazione tra l'IgM index ed il carico lesionale alla RM, così come anche con il grado di atrofia cerebrale.

In uno studio successivo (Villar, 2008) ha dimostrato come solo le IgMOB dirette contro i lipidi specifici (LS+) persistono nel tempo e si associano ad un decorso più aggressivo di malattia, mentre le IgMOB non specifiche per i lipidi (LS-) non erano più presenti ad una riaccentesi successiva. La scomparsa delle IgMOB-LS indicherebbe una risposta immunitaria transitoria e correlata con un decorso di malattia più benigno. Inoltre il numero di cellule B-CD5+ a livello del liquor era molto più alto nei pazienti L+ che nel gruppo di pazienti L-, a sostegno dell'ipotesi che le cellule B-CD5+ sono responsabili della secrezione persistente di anticorpi 'naturali' e che questi si associano ad un decorso di malattia più aggressivo (Villar et al., 2005). Ciò non stupisce se pensiamo che gli anticorpi naturali IgM hanno struttura pentamerica e sono forti attivatori del complemento.

In un altro studio (Thangarajh et al., 2008) è stato valutato il ruolo prognostico delle IgMOB dirette contro antigeni lipidici. Tale studio ha coinvolto 81 pazienti, in cui si è evidenziato che il tempo mediano per la conversione ad una forma secondariamente progressiva di

malattia era di 11 anni nei pazienti con IgMOB dirette contro antigeni lipidici e di 22 anni in quelli senza, mentre il tempo mediano per raggiungere EDSS 4 era 14 anni nel gruppo di pazienti con IgMOB dirette contro antigeni lipidici e di 24 anni nel gruppo senza. Questi autori sostengono che siano le IgMOB specifiche contro i lipidi ad avere un valore prognostico piuttosto che le IgMOB di specificità indeterminata o l'IgM index.

In uno studio più recente, il gruppo di Magraner MJ e coll. (2011) ha dimostrato come la presenza delle IgMOB in pazienti con CIS sia associata ad un precoce incremento del carico lesionale (T2LV, *T2 Lesion Volume*) e del grado di atrofia cerebrale valutati alla RM. Lo studio prospettico, durato 2 anni, ha coinvolto 24 pazienti al loro primo evento di malattia, nei quali sono stati valutati la presenza delle bande oligoclonali (IgGOB, IgMOB-LS) e dati di RM (basale, 1° anno, 2° anno). Pazienti positivi alle IgMOB-LS hanno mostrato un incremento del T2LV in tutte le RM programmate e, alla fine del periodo di follow-up, il T2LV è risultato incrementato di 3 volte rispetto al gruppo che non presentava le IgMOB-LS (3.95 cm³ vs. 1.36 cm³, p=0.001). Anche il grado di atrofia è risultato significativamente aumentato nel gruppo di pazienti positivi (0.73 nei pazienti IgMOB-LS + vs. 0.76 nei pazienti negativi, p=0.03).

La persistenza degli anticorpi IgM sembra essere dovuta dalla produzione di questi da parte delle cellule B-CD5+, una sottopopolazione delle cellule B (*Duan and Morel, 2006*) che è aumentata nei pazienti con MS aggressiva (*Bongioanni P. et al., 1996*). Da queste considerazioni sembra che la presenza di una grande quantità di IgM generi una polireattività nei confronti di strutture poligeneticamente preservate (*Boes M, 2000*), inclusi i fosfolipidi ed i glicolipidi che sono la componente maggiore della mielina, determinando una peggiore ed estesa demielinizzazione e danno assonale.

Risvolti nella pratica clinica

La maggioranza dei pazienti con CIS in associazione ad una RM encefalo basale alterata e la presenza di IgGOB liquorali svilupperà una SMCD. Tali fattori, tuttavia, non forniscono informazioni sul momento in cui ciò avverrà e questa informazione è estremamente rilevante in considerazione anche del fatto che la disabilità futura nei pazienti con CIS sembra essere correlata ad un breve intervallo alla seconda ricaduta oltre che da un elevato tasso di ricadute nei primi due anni, un incompleto recupero dopo il primo evento e dall'EDSS a 5 anni (*Confavreux & Vukusic, 2006; Scalfari et al., 2010; Leray et al., 2010; Kurtzke et al., 1977*). I nostri risultati sono in linea con quanto detto: i pazienti che presentano una ricaduta entro un anno dall'esordio hanno un EDSS significativamente più elevato a 3 anni. (1.5 ± 1.2 vs 1.1 ± 0.9 , $p=0.04$) e al termine del periodo di osservazione (2.4 ± 1.7 vs 1.7 ± 1.5 , $p=0.004$).

La ricerca di IgMOB liquorali, ad oggi, non rientra nella routine diagnostica dei pazienti con CIS. Il presente studio conferma le evidenze crescenti sul ruolo prognosticamente negativo delle IgMOB liquorali nei pazienti con CIS e ne incoraggia la ricerca nella pratica clinica. La proporzione di pazienti CIS con IgMOB liquorali nel nostro studio era del 20%, che è simile alla proporzione riportata da Boscà et al (21.9%) (*Boscà et al., 2010*), mentre sono presenti nel 28-56% dei pazienti con SM (*Sindic et al., 1994; Villar et al., 2002a; Mandrioli et al., 2008*). Le percentuali di positività differiscono molto rispetto a quelle dei pazienti con CIS ed SM con presenza di IgGOB liquorali (72-85% e 95%, rispettivamente). Tale dato, unitamente all'associazione tra IgMOB liquorali, gravità della malattia e ricadute cliniche precoci, le rende adatte per l'identificazione di pazienti a rischio di una conversione precoce a SMCD e che potrebbero quindi beneficiare di una terapia immunomodulante precoce.

Limiti dello studio

I limiti dello studio sono il disegno retrospettivo ed il possibile *bias* di selezione dei pazienti con neurite ottica per cui i pazienti con una RM basale negativa potrebbero non essere stati inviati al nostro centro da parte degli oculisti.

CONCLUSIONI

Nei pazienti con sindrome clinicamente isolata di natura demielinizzante (CIS), la presenza di bande oligoclonali IgM nel liquor (IgMOB) indica un elevato rischio di conversione a Sclerosi Multipla conclamata e di una ricaduta clinica precoce (entro un anno) dall'esordio.

I risultati del presente studio incoraggiano la ricerca delle IgMOB nella routine diagnostica del paziente con CIS, poiché possono fornire informazioni prognostiche nel singolo individuo, utili nel momento della comunicazione della diagnosi e nella pianificazione dell'approccio terapeutico.

Il riscontro di IgMOB liquorali, soprattutto se in aggiunta ad altri fattori prognosticamente sfavorevoli, quali una giovane età all'esordio, un recupero incompleto dopo il primo evento demielinizzante, un elevato carico lesionale alla RM, la presenza di pleiocitosi e di IgGOB liquorali, potrebbe aiutare il neurologo nell'identificazione di pazienti con CIS che potrebbero beneficiare di una terapia immunomodulante precoce, distinguendoli da coloro in cui potrebbe essere invece presa in considerazione una condotta di attesa.

BIBLIOGRAFIA

Amato MP, Zipoli V, Portaccio E. Multiple sclerosis-related cognitive changes: a review of cross-sectional and longitudinal studies. *J Neurol Sci.* 2006 Jun 15; 245(1-2):41-6.

Andersen O. and Runmarker B. Natural history of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 1998; 5:13-14.

Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J,

Ansink BJ, Davies GA, Bellot SM, Stam FC. Diffuse sclerosis. Clinical, neuroradiological and neuropathological findings. *Neuroradiology.* 1985; 27(4):360-1

Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001; 58:2044-2045.

Awad A, Hemmer B, Hartung HP, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2010; 219:1-7.

Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CC, Oksenberg JR. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol.* 1999; 163(9):5133-44.

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of RM criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120:2059-2069.

Barnett MH and Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004; 55:458-468.

Bar-Or A, Calabresi PA, Arnold D, Markowitz C, Shafer S, Kasper LH, Waubant E, Gazda S, Fox RJ, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Smith CH. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol.* 2008; 63(6):803.

Beck RW, Chandler DL, Cole SR, Simon JH, Jacobs LD, Kinkel RP, Selhorst JB, Rose JW, Cooper JA, Rice G, Murray TJ, Sandrock AW. Interferon beta-1a for early multiple sclerosis: CHAMPS trial subgroup analyses. *Ann Neurol.* 2002; 51:481-490.

Beck RW, Smith CH, Gal RL, Xing D et al. Optic Neuritis Study Group. *Arch Neurol.* 2004; 61(9):1386-9.

Beck RW, Trobe JD, Moke PS, Gal RL et al. Optic Neuritis Study Group. High- and low-risk profiles for the development of multiple sclerosis within 10 years after optic neuritis: experience of the optic neuritis treatment trial. *Arch Ophthalmol.* 2003; 121(7):944-9.

Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349:139-145.

Bielekova B, Kadom N, Fisher E, Jeffries N, Ohayon J, Richert N, Howard T, Bash CN, Frank JA, Stone L, Martin R, Cutter G, McFarland HF. RM as a marker for disease heterogeneity in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005; 65(7):1071-6.

Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000; 37: 1141-1149.

Bongioanni P. Lymphocyte subsets in multiple sclerosis. A study with two-colour fluorescence analysis. *J Neurol Sci*. 1996; 139:71-77.

Boscá I., Magraner M.J., Coret F., Alvarez-Cermeño J.C., Simó-Castelló M., Villar L.M., Casanova B., 2010. The risk of relapse after a clinically isolated syndrome is related to the pattern of oligoclonal bands. *J Neuroimmunol*. 226, 143-146.

Brettschneider J, Mogel H, Lehmensiek V, Ahlert T, Süßmuth S, Ludolph AC, Tumani H. Proteome analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurochem Res*. 2008; 33(11):2358-63.

Brex P.A., Ciccarelli O., Jonathon I., O'Riordan J.I., Sailer M., Thompson A.J., Miller D.H., 2002. A longitudinal study of abnormalities on RM and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 346, 158–164.

Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on RM and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002; 346:158-164.

Brex PA, Miszkiel KA, O'Riordan JI, Plant GT, Moseley IF, Thompson AJ, Miller DH. Assessing the risk of early multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes: the role of a follow up RM. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70(3):390-3.

Brex PA, Parker GJ, Leary SM, Molyneux PD, Barker GJ, Davie CA, Thompson AJ, Miller DH. Lesion heterogeneity in multiple sclerosis: a study of the relations between appearances on T1 weighted images, T1 relaxation times, and metabolite concentrations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000; 68(5):627-32.

Comi G, Martinelli V, Rodegher M et al.; PreCISe study group. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010; 375(9724):143.

Comi G., Filippi M., Barkhof F., Durelli L., Edan G., Fernández O., Hartung H., Seeltrayters P., Sørensen P.S., Rovaris M., Martinelli V., Hommes O.R., 2001. Effect of early interferon

treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*. 357, 1576-1582.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372(9648):1502-17.

Compston A, Sadovnick AD. Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg*. 1992; 5(2):175-81.

Compston A. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997; 62(6):553-61.

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

Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000; 343:1430-1438.

Confavreux C. and Vukusic S., 2006. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 129, 606-616.

Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurology*. 2002; 249:375-389.

Duquette P, Murray TJ, Pleines J, Ebers GC, Sadovnick D, Weldon P, Warren S, Paty DW, Upton A, Hader W, et al. Multiple sclerosis in childhood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr*. 1987; 111(3):359-63.

Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 1992; 19(4):466-71.

Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol*. 1994; 54(1-2):1-17.

Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008; 7(3):268-77.

Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2000; 21:S815-S817.

Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2003; 9:260-274.

Fischer L, Korfel A, Pfeiffer S, Kiewe P, Volk HD, et al. CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:5968-5973.

Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkief KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH. Disability and T2 RM lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008; 131(Pt 3):808-17.

Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62:865-870.

Frequin STFM, Barkhof F, Lamers KJB, Hommes OR, Borm GF. CSF myelin basic protein, IgG and IgM levels in 101 multiple sclerosis patients before and after treatment with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand* 1992; 86:291-297.

Frohman EM, Goodin DS, Calabresi PA, Corboy JR, Coyle PK, Filippi M, Frank JA, Galetta SL, Grossman RI, Hawker K, Kachuck NJ, Levin MC, Phillips JT, Racke MK, Rivera VM, Stuart WH. The utility of RM in suspected MS: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2003; 61(5):602-11.

García-Barragán N., Villar L.M., Espiño M., Sádaba M.C., González-Porqué P., Alvarez-Cermeño J.C., 2009. Multiple sclerosis patients with anti-lipid oligoclonal IgM show early favourable response to immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol*. 16, 380-385.

Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri M. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120:1461-1483.

Genain CP, Canella B, Hauser SL, and Raine CS. Identification of the autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999; 5:170-175.

Gout O, Bouchareine A, Moulignier A, Deschamps R, Papeix C, Gorochov G, Héran F, Bastuji-Garin S. Prognostic value of cerebrospinal fluid analysis at the time of a first demyelinating event. *Journal of Multiple Sclerosis* 2010; 17(2):164-72.

Granieri E, Economou NT, De Gennaro R, Tola MR, Caniatti L, Govoni V, Fainardi E, Casetta I. Multiple sclerosis in the province of Ferrara: evidence for an increasing trend. *J Neurology*. 2007; 254(12):1642-8.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH. HERMES Trial Group. -cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis *N Engl J Med*. 2008; 358(7):676-88.

Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM, Ruiz-Peña JL, Páramo MD. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002; 105:158-163.

Jacobs L.D., Beck R.W., Simon J.H., Kinkel R.P., Brownschidle C.M., Murray T.J., Simonian N.A., Slasor P.J., Sandrock A.W., 2000. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*. 343, 898-904.

Jacobs L.D., Beck R.W., Simon J.H., Kinkel R.P., Brownschidle C.M., Murray T.J., Simonian N.A., Slasor P.J., Sandrock A.W., and the CHAMPS Study Group., 2001.

Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *Am J Ophthalmol.* 131, 154-155.

Jacobs LD, Wende KE, Brownscheidle CM, Apatoff B, Coyle PK et al. A profile of multiple sclerosis: the New York State Multiple Sclerosis Consortium. *Multiple Sclerosis.* 1999; 5(5):369-76.

Jenkins TM, Ciccarelli O, Atzori M, Wheeler-Kingshott CA, Miller DH, Thompson AJ, Toosy AT. Early pericalcarine atrophy in acute optic neuritis is associated with conversion to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011; 82(9):1017-21.

Jenkins TM, Thompson AJ. Diagnosing and managing multiple sclerosis. *Practitioner.* 2009; 253(1721):25-30, 2-3.

Jensen PE. Stable association of processed antigen with antigen-presenting cell membranes. *J Immunology.* 1989; 143(2):420-5.

Jin YP, de Pedro-Cuesta J, Huang YH, Söderström M. Predicting multiple sclerosis at optic neuritis onset. *Multiple Sclerosis.* 2003; 9(2):135-41.

Jongen P.J.H., Lycklama a Nijeholt G., Lamers K.J.B., Doesburg W.H., Barkhof F., Lemmens W.A.J.G., Klasen I.S. and Hommes O.R., 2007. Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial RM lesion load in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 58, 90-5.

Kaiser R, Lücking CH. Intrathecal synthesis of IgM and IgA in neurological diseases: comparison of two formulae with isoelectric focusing. *Clin Chim Acta* 1993; 216:39-51.

Kappos L, Freedman MS, Polman CH, et al. Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* 2009; 8:987-997.

Kappos L. Clinical trials of immunosuppression and immunomodulation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunology.* 1988; 20(2-3):261-8.

Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S., Edan G., Hartung H.P., Miller D.H., Montalban X., Barkhof F., Bauer L., Jakobs P., Pohl C. and Sandbrink R., 2006. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology.* 67, 1242-1249.

Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, Hillert J, Piehl F, Olsson T. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple Sclerosis.* 2011; 17(3):335-43.

Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Haemmerle M, Rainer C, Deisenhammer F, Schocke M, Berger T, Reindl M. Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2008; 3(7):2559.

Kurtzke J.F., Beebe G.W., Nagler B., Kurland L.T., Auth T.L., 1977. Studies on the natural history of multiple sclerosis--8. Early prognostic features of the later course of the illness. *J Chron Dis.* 30, 819-830.

Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology.* 1985; 35(5):672-8.

Kurtzke JF. Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand.* 1980; 62(2):65-80.

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

Leray E., Yaouanq J., Le Page E., Coustans M., Laplaud D., Oger J. and Edan G., 2010. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain.* 133, 1900-1913.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996; 46(4):907-11.

Lucchinetti CF, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47:707-717.

Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathology.* 1996; 6(3):259-74.

Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE, Lassmann H. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002; 125:1450-1461.

Magraner M.J, Bosca I, Simó-Castelló M., García-Martí G., Alberich-Bayarri A., Coret F., Alvarez-Cermeño J. C., Martí-Bonmatí L., Villar L.M., Casanova B., 2012. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiol.* 54, 5-12.

Mandrioli J., Sola P., Bedin R., Gambini M. and Merelli E., 2008. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol.* 255, 1023-31.

Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Martínez San Millán J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology.* 2006; 66(4):576-8.

Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999; 5(2):101-4.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurology.* 2001; 50:121-127.

McDonald WI, Noseworthy JH. *Sclerosi Multipla. Blue Book of Practical Neurology.* 2004; 2:33-36.

Mead R.J., Singhrao S.K., Neal J.W., Lassmann H., and Morgan B.P., 2002. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol.* 168, 458-465.

Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. 2005; 4(5):281-8.

Miller D.H., Chard D.T. and Ciccarelli O., 2012. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol.* 11, 157-169.

Miller DH, Albert PS, Barkhof F, Francis G, Frank JA, Hodgkinson S, Lublin FD, Paty DW, Reingold SC, Simon J. Guidelines for the use of magnetic resonance techniques in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39:6-16.

Miller DH, Barkhof F, Frank JA et al. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *J Brain* 2002; 125:1676–1695.

Minneboo A, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Knol DL, Castelijns JA. Infratentorial lesions predict long-term disability in patients with initial findings suggestive of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2004; 61(2):217-21.

Mix E, Olsson T, Correale J, Baig S, Kostulas V, Olsson O, Link H. B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990; 79:21-27.

Montalban X. The pros and cons of early treatment of relapsing forms of multiple sclerosis. *J Neurology* 2004; 251Suppl 4:IV30- IV34.

Morrissey S.P., Miller D.H., Kendall B.E., Kingsley D.P., Kelly M.A., Francis D.A., MacManus D.G., McDonald W.I., 1993. The significance of brain magnetic resonance imaging abnormalities at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. A 5-year follow-up study. *Brain.* 116, 135–146.

Mowry E.M., Pesic M., Grimes B., Deen S.R., Bacchetti P., and Waubant E., 2009. Clinical predictors of early second event in patients with clinically isolated syndrome. *J Neurol.* 256, 1061-1066.

Nilsson P, Larsson EM, Maly-Sundgren P, Perfekt R, Sandberg-Wollheim M. Predicting the outcome of optic neuritis: evaluation of risk factors after 30 years of follow-up. *J Neurology.* 2005; 252(4):396-402.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000; 28;343(13):938-52.

Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature.* 1999; 399(6738 Suppl):A40-47.

O’Riordan J.I., Thompson A.J., Kingsley D.P.E., MacManus D.G., Kendall B.E., Rudge P., McDonald W.I., Miller D.H., 1998. The prognostic value of brain RM in clinically isolated syndromes of the CNS: a 10 year follow-up. *Brain.* 121, 495–503.

Optic Neuritis Study Group. High- and low-risk profiles for the development of multiple sclerosis within 10 years after optic neuritis: experience of the optic neuritis treatment trial. *Arch Ophthalmol.* 2003; 121:944-949.

Optic Neuritis Study Group. Multiple Sclerosis Risk after Optic Neuritis: Final Optic Neuritis Treatment Trial Follow-Up. *Arch Neurology.* 2008; 65(6):727-732.

Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature.* 1990; 346(6280):183-7.

Pelayo R, Montalban X, Minoves T, Moncho D, Rio J, Nos C, Tur C, Castillo J, Horga A, Comabella M, Perkal H, Rovira A, Tintoré M. Do multimodal evoked potentials add information to RM in clinically isolated syndromes?. *Multiplet Sclerosis.* 2010; 16(1):55-61.

Pelayo R, Tintoré M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grivé E, Téllez N, Comabella M, Montalban X. Polyregional and hemispheric syndromes: a study of these uncommon first attacks in a CIS cohort. *Multiple Sclerosis.* 2007; 13(6):731-6.

Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77(8):953-5.

Piddlesden SJH, Lassmann H, Zimprich BP, Morgan BP, Linington C. The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathology.* 1993; 143:555-564.

Polman C., Kappos L., Freedman M.S., Edan G., Hartung H.P., Miller D.H., Montalbán X., Barkhof F., Selmaj K., Uitdehaag B.M.J., Dahms S., Bauer L., Pohl C., Sandbrink R., 2008.

Subgroups of the BENEFIT study: risk of developing MS and treatment effect of interferon beta-1b. *J Neurol.* 255, 480-487.

Polman CH, Reingold SC, Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann.Neurol.* 2005; 58:840-846.

Polman CH, Stephen CR, Banwell B. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69:292–302.

Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001; 184:101–122.

Rojas JI, Patrucco L, Cristiano E. Oligoclonal bands and RM in clinically isolated syndromes: predicting conversion time to multiple sclerosis Received: *Neurology.* 2010; 257:1188-1191.

Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Dou W. Antibody-mediated CNS demyelination II. Focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM antisulfatide-secreting hybridoma. *J Neurocytol.* 2003; 32:265-276.

Rosenbluth J., Schiff R., Liang W.L., Dou W.K. and Moon D., 1999. Antibody-mediated CNS demyelination: focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM anti-galactocerebroside-secreting hybridoma. *J Neurocytol.* 28, 397-416.

Rothstein T. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunology.* 2002; 168:4257-4261.

Rovaris M, Agosta F, Sormani MP, Inglese M, Martinelli V, Comi G, Filippi M. Conventional and magnetization transfer RM predictors of clinical multiple sclerosis evolution: a medium-term follow-up study. *Brain* 2003; 126:2323-2332.

Ruet A., Deloire M.S., Ouallet J.C., Molinier S., and Brochet B., 2011. Predictive factors for multiple sclerosis in patients with clinically isolated spinal cord syndrome. *Mult Scler.* 17, 312-318

Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain.* 1993;116:117-134.

Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet.* 2000; 58(6):431-5.

Sadovnick AD, Yee IM, Guimond C, Reis J, Dyment DA, Ebers GC. Age of onset in concordant twins and other relative pairs with multiple sclerosis. *Am J Epidemiology.* 2009; 1;170(3):289-96.

Scalfari A., Neuhaus A., Degenhardt A., Rice G.P., Muraro P., Daumer M. and Ebers G.C., 2010. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain.* 133, 1914-1929.

Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol*. 2007; 14(8):907-11.

Schroeder, H.W., Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J.Allergy Clin. Immunol*. 2010; 125, S41–S52.

Scott TF, Kassab SL, Singh S. Acute partial transverse myelitis with normal cerebral magnetic resonance imaging: transition rate to clinically definite multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2005;11(4):373-7.

Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 1998; 4:127-131.

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

Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain* 1991; 114:181-195.

Sharief MK, Thompson EJ. The predictive value of intrathecal immunoglobulin synthesis and magnetic resonance imaging in acute isolated syndromes for subsequent development of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1991b; 29:147–151.

Sindic CJM, Monteyne P, Laterre EC. Occurrence of oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of neurological patients: an immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neurol Sci* 1994; 124:215-219.

Sola P., Mandrioli J., Simone A.M., Ferraro D., Bedin R., Annecca R., Venneri M.G., Nichelli P.F. and Merelli E., 2011. Primary progressive versus relapsing-onset multiple sclerosis: presence and prognostic value of cerebrospinal fluid oligoclonal IgM. *Mult Scler*. 17, 303-311.

Stauch C, Reiber H, Rauchenzauner M, Strasak A, Pohl D, Hanefeld F, Gärtner J, Rostásy KM. Intrathecal IgM synthesis in pediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Multiple Sclerosis*. 2011; 17(3):327-34.

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, et al. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 1998; 43:465-471.

Swanton J. K., Fernando K., Dalton C. M., Miszkiel K. A., Thompson A. J., Plant G. T., Miller D. H., 2006. Is the frequency of abnormalities on magnetic resonance imaging in isolated optic neuritis related to the prevalence of multiple sclerosis? A global comparison. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 77, 1070–1072

Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, Miszkief KA, Altmann DR, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH. Early RM in optic neuritis: the risk for clinically definite multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2010; 16(2):156-65.

Tas MW, Barkhof F, van Walderveen MA, Polman CH, Hommes OR, Valk J. The effect of gadolinium on the sensitivity and specificity of MR in the initial diagnosis of multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995; 16(2):259-64.

Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström AK, Hillert J, Alvarez-Cermeño JC, Masterman T, Villar LM. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2008;14(9):1208-13.

Tintore M, Rovira A, Arrambide G, Mitjana R, Río J, Auger C, Nos C, Edo MC, Castelló J, Horga A, Perez-Miralles F, Huerga E, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010; 23;75(21):1933-8.

Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology*. 2003; 60:27-30.

Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. Optic neuritis brainstem syndromes and myelitis: early conversion to multiple sclerosis. *Med Clin (Barc)* 1999; 112:693-694.

Tintoré M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grivé E, Téllez N, Pelayo R, Comabella M, Montalban X. Is optic neuritis more benign than other first attacks in multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2005; 57(2):210-5.

Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Téllez N, Pelayo R, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Basale RM predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006; 26;67(6):968-72.

Tintoré M., Rovira A., Río J., Tur C., Pelayo R., Nos C., Téllez N., Perkal H., Comabella M., Sastre-Garriga J., Montalban X., 2008. Do oligoclonal bands add information to RM in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* . 70, 1079-1083.

Tintore´ M, Rovira A, Brieva L, Grive E, Jardi R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to SMCD. *Multiple Sclerosis*. 2001; 7:359-363.

Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*. 1996; 85:345–356.

Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?. *Journal of Annu Rev Neurosci* 2008; 31:247-269.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008; 172(1):146-55.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199:971-979.

Villar L.M., González-Porqué P., Masjuán J., Alvarez-Cermeño J.C., Bootello A, Keir G., 2001. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods.* 258, 151-155.

Villar L. M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J. C., 2002a. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* . 58, 824-826.

Villar L.M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J. .C. 2002b. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology.* 59, 555-559.

Villar L.M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J.C., 2003. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 53, 222-226.

Villar JM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005; 115:187-194.

Villar L, García-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, et al. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Multiple Sclerosis.* 2008; 14:183-187.

Villar LM, Espiño M, Cavanillas ML, Roldán E, Urcelay E, de la Concha EG, Sádaba MC, Arroyo R, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño JC. Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2010; 137(1):51-9.

Weinshenker BG, Bass GP, Rice J, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain.* 1989a; 112:133-146.

Weinshenker BG, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study, 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain.* 1991a; 114:1045-1056.

Weinshenker BG, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study, 4. Applications to planning and interpretation of clinical trials. *Brain.* 1991b; 114:1057-1067.

Weinshenker BG. Natural History of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 1994; 36:S6-S11.

Zeman AZ, Kidd D, McLean BN, Kelly MA, Francis DA, Miller DH, Kendall BE, Rudge P, Thompson EJ, McDonald WI. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996; 60:27-30.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine e hanno permesso e favorito sia i miei studi che la realizzazione di questa tesi.

I miei ringraziamenti vanno innanzitutto alla Dr.ssa Patrizia Sola per gli insegnamenti ed il sostegno che mi ha fornito in questi anni e per l'incoraggiamento e l'aiuto che mi ha dato nel trovare la mia strada.

Grazie al mio relatore Prof. Paolo Nichelli per la gentilezza, la disponibilità e la fiducia che mi ha sempre dimostrato.

Grazie anche a tutto il "gruppo SM": Francesca Vitetta, Anna Maria Simone, Roberta Bedin, Veronica Galli, Francesca Prompicai e Patrizia Levanti, compagne di lavoro e di divertimenti, e che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro. Con loro ho capito veramente cosa vuol dire il lavoro di squadra.

Un profondo ringraziamento infine va alla mia famiglia che mi accompagna e mi sostiene nei miei percorsi di vita: la mia famiglia "di origine": mamma, papà e Fiamma, punti di riferimento da cui ho ricevuto amore, educazione ed esempio, e la mia famiglia "nuova", fonte di felicità: Manu e Anna.

Grazie.