

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA E MEDICINA INTERDISCIPLINARE

DOTTORATO IN NEUROSCIENZE

-XXV CICLO-



**CARATTERIZZAZIONE DI UN MODELLO DI
ENCEFALOMIELITE AUTOIMMUNE
SPERIMENTALE E RUOLO NEUROPROTETTIVO
DEL PROGESTERONE**

COORDINATORE:

CHIAR.MO PROF. GUIDO CAVALETTI

TUTOR:

CHIAR.MO PROF. GUIDO CAVALETTI

TESI DI DOTTORATO DI:

Dott.ssa ELISA BALLARINI

MATRICOLA 043984

RIASSUNTO E SCOPO DEL LAVORO

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale (SNC) a eziologia autoimmune. La forma più frequente di SM è quella Recidivante-Remittente (SM-RR) caratterizzata dall'alternanza tra fasi di remissione e di riacutizzazione sintomatologica.

I meccanismi eziopatogenetici che portano allo sviluppo e alla progressione della SM non sono ancora del tutto chiari.

La risposta infiammatoria che si sviluppa a livello del SNC e che si associa al rilascio di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie sembra possa svolgere un ruolo nella comparsa di malattia, nello sviluppo di recidive così come nella remissione sintomatologica.

E' stata descritta una correlazione tra SM e steroidi sessuali. Infatti, l'incidenza e la gravità della SM presentano differenze rilevanti tra uomini e donne. Inoltre, condizioni fisiologiche caratterizzate da alterati livelli plasmatici degli ormoni sessuali, come ad esempio la gravidanza, sono in grado di modificare il decorso della patologia.

Queste osservazioni cliniche suggeriscono quindi che gli steroidi sessuali possano svolgere un ruolo nell'eziopatogenesi della SM.

Tale ipotesi è avvalorata dal fatto che gli ormoni steroidei, prodotti dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali, esercitano la loro azione endocrina sul SNC il quale, non solo è in grado di metabolizzare tali ormoni in derivati attivi, ma può anche sintetizzare a livello locale neurosteroidi in grado di agire in maniera paracrina o autocrina su neuroni e cellule gliali.

Inoltre, in diversi modelli animali è stato dimostrato che gli steroidi neuroattivi (i.e. ormoni steroidei e neurosteroidi che esercitano la loro azione sul SNC) possiedono proprietà neuroprotettive, avvalorando la possibilità di utilizzare queste molecole in patologie neurodegenerative quali la SM.

L'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE) è il modello di SM in grado di riprodurre i principali aspetti neuroimmunologici e istopatologici della malattia. L'induzione di EAE nel ratto Dark Agouti (DA) dà origine ad una patologia con decorso cronico, caratterizzata dal raggiungimento di un

picco clinico a cui seguono fasi di remissione e riacutizzazione di malattia. L'EAE indotta nel ratto DA rappresenta quindi il modello sperimentale più adeguato allo studio della forma Recidivante-Remittente della SM (SM-RR). Come dimostrato da Giatti e Caruso (2010), l'induzione dell'EAE in ratti DA è in grado di alterare i livelli degli steroidi neuroattivi nel SNC sia nella fase di acuzie clinica che nella fase più avanzata di cronicizzazione. Inoltre il profilo degli steroidi neuroattivi è differentemente modulato in fase acuta e cronica di patologia, suggerendo che tali steroidi possano svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'EAE.

Scopo del primo lavoro qui presentato è stato quello di estendere le osservazioni di Caruso e Giatti utilizzando il medesimo ceppo di ratti (DA) ma inducendo l'EAE mediante un protocollo di immunizzazione differente.

Oltre a valutare la modulazione degli steroidi neuroattivi nel midollo spinale di animali affetti da EAE è stato analizzato il profilo neuroinfiammatorio, la demielinizzazione e il danno assonale in diverse fasi della patologia al fine di comprendere se e come questi differenti parametri si evolvano con il progredire dell'EAE.

Il fine ultimo di questa caratterizzazione è stato quello di individuare aspetti potenzialmente rilevanti nella patogenesi dell'EAE e che potessero essere di spunto per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sull'utilizzo di steroidi neuroattivi.

A 14 giorni dall'immunizzazione (i.e. a picco di malattia) è stata osservata una generale riduzione nel livello degli steroidi neuroattivi associata ad uno stato neuroinfiammatorio acuto, all'alterazione della componente proteica della mielina e alla comparsa di danno assonale.

A 45 giorni dall'induzione dell'EAE, i livelli della maggior parte degli steroidi neuroattivi sono tornati a valori confrontabili a quelli degli animali sani di controllo, fatta eccezione per il progesterone (PROG) il cui livello si riduce in modo significativo. La modulazione nel profilo degli steroidi neuroattivi è stata correlata a segni neurologici più lievi, a una ridotta, seppur persistente, risposta neuroinfiammatoria e all'insorgenza di assonopatia.

Di particolare interesse è risultata la significativa riduzione nei livelli di PROG osservata nel midollo spinale di ratti DA in fase avanzata di patologia. Infatti, il PROG è un noto immunosoppressore ed è in grado di promuovere processi di rimielinizzazione. Inoltre il ruolo neuroprotettivo del PROG è stato documentato in modelli acuti di EAE.

E' stato quindi ipotizzato che la riduzione nei livelli di PROG osservata potesse avere un ruolo nella cronicizzazione dell'EAE, contribuendo alla compromissione dei meccanismi di rigenerazione.

Sulla base di queste evidenze è stato condotto un ulteriore studio con lo scopo di valutare se il trattamento con PROG potesse avere un effetto neuroprotettivo nel nostro modello di EAE.

Il PROG è stato somministrato sottocute alla dose di 1mg/ratto e con una frequenza di giorni alterni partendo dal giorno d'induzione dell'EAE. La sperimentazione è stata protratta per 44 giorni al fine di valutare gli effetti a lungo termine del trattamento con PROG e in modo da ottenere delle osservazioni rilevanti da un punto di vista clinico.

Il trattamento con PROG è stato in grado di migliorare la sintomatologia neurologica e di ridurre il grado di neuroinfiammazione negli animali affetti da EAE. Inoltre il PROG ha riportato l'espressione proteica di MBP, diminuita dalla patologia, ai livelli osservati negli animali sani di controllo ed ha indotto il recupero funzionale degli assoni dimostrando quindi un effetto neuroprotettivo.

Infine, analizzando il livello dei metaboliti del PROG nel midollo spinale, è stato possibile ipotizzare che l'azione del PROG sia prevalentemente mediata dal suo metabolita diidroprogesterone.

In conclusione, nel primo studio è stata eseguita un'accurata caratterizzazione del modello di EAE indotta in ratti DA maschi che ha consentito di osservare come il profilo neuroinfiammatorio ed il livello di steroidi neuroattivi nel SNC si evolvano con il progredire dell'EAE.

Nello specifico, la significativa riduzione nei livelli di PROG ha indicato un suo potenziale ruolo nella cronicizzazione della patologia.

Nella seconda parte dello studio, la somministrazione di PROG è stata in grado di attenuare la gravità sintomatologica dell'EAE regolando la neuroinfiammazione, aumentando l'espressione proteica di MBP e promuovendo il recupero funzionale degli assoni.

E' stato dunque dimostrato che il PROG è in grado di mediare un effetto neuroprotettivo anche in un modello cronico di EAE, ossia in una condizione sperimentale che ricalca adeguatamente la forma di SM-RR.

I nostri risultati pongono quindi le basi per un possibile approccio terapeutico della SM basato sull'utilizzo di composti di sintesi analoghi del PROG.

Lo studio è stato condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Melcangi R.C. Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano.

INDICE

RIASSUNTO E SCOPO DEL LAVORO	I
INTRODUZIONE	1
1. STEROIDI NEUROATTIVI	1
1.1 Neurosteroidi e steroidi neuroattivi.....	1
1.2 Scoperta dei neurosteroidi	1
1.3 Biosintesi dei neurosteroidi.....	2
1.4 Funzione degli steroidi neuroattivi.....	5
1.4.1 Dimorfismo sessuale	5
1.4.2 Neuromodulazione.....	5
2. RUOLO DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SNP	7
2.1 Sintesi mielinica	7
2.2 Neuroprotezione	8
3. RUOLO DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SNC	10
3.1 Dimorfismo sessuale nelle patologie del SNC	10
3.2 Neuroprotezione nelle patologie del SNC	12
4. SCLEROSI MULTIPLA	16
4.1 La Sclerosi multipla	16
4.1.1 Epidemiologia.....	17
4.1.2 Eziopatogenesi	18
4.1.3 Quadri clinici	21
4.1.4 Decorso e Prognosi	23
4.1.5 Anatomia patologica	25
4.1.6 Terapia	26
4.1.6.a Trattamento delle ricadute.....	26
4.1.6.b Prevenzione delle ricadute e rallentamento della progressione	27
4.2 Steroidi Neuroattivi e dimorfismo sessuale nella SM.....	30
4.3 Steroidi Neuroattivi e neuroprotezione nella SM	32
5. ENCEFALOMIELITE AUTOIMMUNE SPERIMENTALE.....	33
5.1 L'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale	33
5.2 Modelli animali di Sclerosi Multipla.....	34
5.2.1 Modelli virali	35
5.2.2 Modelli di demielinizzazione mediati da tossici.....	36
5.2.3 Modelli transgenici	37

5.2.4	Modello immunitario: L'EAE	38
5.3	L'EAE nel ratto	39
5.3.1	L'EAE nel ratto Lewis.....	39
5.3.2	L'EAE nel ratto Dark Agouti.....	40
5.4	Steroidi Neuroattivi e dimorfismo sessuale nell'EAE.....	42
5.5	Steroidi Neuroattivi e neuroprotezione nell'EAE	43
5.5.1	Androgeni nell'EAE.....	43
5.5.2	Estrogeni nell'EAE.....	44
5.5.3	Progesterone nell'EAE.....	45
5.5.4	Estrogeni e Progesterone in co-somministrazione nell'EAE	46
MATERIALI E METODI	47
1.	Stabulazione degli animali	47
2.	Induzione dell'EAE in ratti Dark Agouti	47
3.	Trattamento con progesterone (PROG)	48
4.	Valutazioni cliniche	48
5.	Analisi istopatologica	49
6.	Analisi Immunoistologica	50
7.	Analisi morfometrica.....	52
8.	Analisi citofluorimetrica	52
9.	RNase protection assay (RPA).....	53
10.	Real time-PCR.....	54
11.	Western blotting.....	56
12.	Attività della pompa Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasica.....	58
13.	Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS-MS) .	60
14.	Analisi statistica.....	61
RISULTATI	62
1.	CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO DI EAE IN RATTI DARK AGOUTI	62
1.1	Decorso clinico	62
1.2	Profilo neuroimmunologico.....	64
1.2.1	Analisi istologica dell'infiltrato infiammatorio.....	65
1.2.2	Quadro immunoistologico dell'infiltrato infiammatorio	67
1.2.3	Analisi delle sottopopolazioni leucocitarie	72
1.2.4	Attivazione della microglia	73
1.2.5	Espressione genica di citochine anti-infiammatorie e pro- infiammatorie.....	76
1.3	Demielinizzazione	78

1.3.1	Espressione genica di MBP	78
1.4	Danno assonale.....	80
1.4.1	Valutazione dell'attività della pompa Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasica	81
1.4.2	Valutazione della fosforilazione del neurofilamento-H.....	82
1.5	Profilo degli steroidi neuroattivi.....	84
1.5.1	Livello degli steroidi neuroattivi.....	85
1.5.2	Espressione degli enzimi steroidogenici	86
2.	RUOLO NEUROPROTETTIVO DEL PROGESTERONE NEL MODELLO DI EAE IN RATTI DARK AGOUTI	88
2.1	Effetto del PROG sul decorso clinico dell'EAE.....	89
2.2	Profilo neuroimmunologico.....	91
2.2.1	Effetto del PROG sull'infiltrazione infiammatoria.....	91
2.2.2	Effetto del PROG sull'attivazione della microglia	93
2.2.3	Effetto del PROG sull'espressione genica di citochine pro- e anti- infiammatorie	95
2.3	Demielinizzazione	97
2.3.1	Analisi immunohistologica per MBP	97
2.3.2	Effetto del PROG sull'espressione proteica di MBP	99
2.4	Danno assonale.....	100
2.4.1	Effetto del PROG sull'attività della pompa Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasica	100
2.4.2	Effetto del PROG sulle subunità catalitiche della pompa	101
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasica		101
2.4.3	Effetto del PROG sulla fosforilazione del neurofilamento-H	102
2.5	Profilo degli steroidi neuroattivi: livello dei metaboliti del PROG.....	104
	DISCUSSIONE.....	106
	BIBLIOGRAFIA	121

INTRODUZIONE

1. STEROIDI NEUROATTIVI

1.1 Neurosteroidi e steroidi neuroattivi

E' noto che gli ormoni steroidei rilasciati da ghiandole endocrine quali le gonadi e le ghiandole surrenali esercitano un'azione sul sistema nervoso. Tuttavia studi condotti negli ultimi decenni hanno dimostrato che il sistema nervoso non è solo un target per gli ormoni steroidei ma è in grado esso stesso di sintetizzare steroidi con funzione autocrina e paracrina.

Le molecole di natura steroidea sintetizzate da neuroni e cellule gliali sono state definite neurosteroidi (Baulieu, 1999). Oltre agli ormoni steroidei ed ai neurosteroidi esistono anche steroidi di sintesi in grado di regolare l'attività del sistema nervoso.

Gli ormoni steroidei, i neurosteroidi e gli steroidi di sintesi che sono in grado di regolare le funzioni neuronali sono stati raggruppati nella famiglia degli steroidi neuroattivi (Paul e Purdy, 1992). Gli steroidi neuroattivi hanno la capacità di regolare sia parametri omeostatici, come lo sviluppo del sistema nervoso e la plasticità neuronale, che meccanismi patofisiologici come i processi neurodegenerativi (Dubrovsky, 2006; Melcangi e Garcia-Segura, 2006; Melcangi e Panzica, 2006).

Negli ultimi decenni è stata prodotta una vasta letteratura che dimostra come gli steroidi neuroattivi possano rappresentare dei buoni candidati per la terapia di malattie neurodegenerative.

1.2 Scoperta dei neurosteroidi

Furono Corpechot e collaboratori a dimostrare che nel cervello di roditori, neuroni e cellule della glia sono in grado di sintetizzare neurosteroidi. Infatti, essi osservarono che quantità dosabili di pregnenolone (PREG), deidroepiandrosterone (DHEA) e dei loro derivati solfati persistevano a livello del SNC nonostante gli animali avessero subito gonadectomia e surrenalectomia. Inoltre dimostrarono che in condizioni di stress i livelli di tali ormoni aumentavano nel SNC in maniera indipendente dai corrispondenti livelli plasmatici (Corpechot et al., 1981, 1983).

L'esistenza dei neurosteroidi è stata in seguito confermata in diverse specie animali ed è stata dimostrata la loro influenza sul comportamento e sullo sviluppo cerebrale (Schilinger et al., 2011). Le conoscenze derivate dagli studi pionieristici di Corpechot ci consentono oggi di definire i neurosteroidi come composti endogeni di natura steroidea sintetizzati nei neuroni o nelle cellule gliali del sistema nervoso centrale (SNC) o periferico (SNP). Per essere definiti tali, i neurosteroidi devono persistere in quantità sostanziali nel sistema nervoso anche dopo la rimozione delle ghiandole steroideogeniche (Baulieu, 1999).

I neurosteroidi agiscono come fattori paracrini ed autocrini regolando l'attività dei classici recettori nucleari per gli steroidi oppure attraverso la modulazione di recettori di membrana come i recettori dell'acido γ -amino butirrico (GABA_A), i recettori di membrana accoppiati alle proteine G (Zhu et al., 2003), i canali del calcio di tipo T (Hosie et al., 2006), i recettori dell'N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wu et al., 1991) e sigma1 (Maurice et al., 2006).

1.3 Biosintesi dei neurosteroidi

Al fine di dimostrare che gli steroidi neuroattivi fossero effettivamente biosintetizzati a livello di SNP e SNC, furono condotti numerosi studi atti a evidenziare che le cellule nervose e/o le cellule gliali esprimessero gli enzimi della steroidogenesi in forme biologicamente attive (Baulieu, 1999).

Tali studi confermarono che nel sistema nervoso sono presenti e attive sia le proteine necessarie al trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio, che gli enzimi chiave della steroidogenesi.

In Fig.1 sono rappresentati in forma schematica i processi implicati nella sintesi degli steroidi.

Il trasferimento del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna rappresenta il punto limitante di tutto il processo steroidogenico. Tale trasporto viene effettuato dalla proteina StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein; Lavaque et al., 2006) e dal traslocatore proteico TSPO (Papadopoulos et al., 2006). E' stato dimostrato che nel SNP la proteina StAR è maggiormente espressa nelle cellule di Schwann (Benmessahel et al., 2004) mentre nel SNC StAR viene espressa in

tutte le aree cerebrali ma solo in specifiche popolazioni neuronali e astrogliali del ratto (Sierra et al., 2003) e dell'uomo (Melcangi et al., 2011). Il TSPO (proteina traslocatrice di 18 kDa) è un traslocatore mitocondriale espresso principalmente nelle cellule gliali sia del SNP che del SNC (Papadopoulos, et al., 2006).

Il primo passaggio enzimatico necessario alla sintesi di tutte le classi di ormoni steroidei è rappresentato dalla conversione del colesterolo a pregnenolone (PREG). Tale conversione è catalizzata dall'enzima citocromo P450 side chain cleavage (P450scc) che si colloca a livello della membrana mitocondriale interna (Fig.1). L'enzima citocromo P450scc è stato inizialmente localizzato nell'encefalo di ratto (Le Goascogne et al., 1987) e successivamente anche nel midollo spinale, nei gangli delle radici dorsali (Compagnone et al., 1995) e nel SNC dell'uomo (Schumacher et al., 2004; Melcangi et al., 2011).

Il PREG è convertito in progesterone (PROG) tramite l'enzima 3β -idrossisteroide deidrogenasi (3β -HSD). Il PROG viene successivamente convertito in diidroprogesterone (DHP) dall'enzima 5α -reduttasi (5α R). Esistono due isoforme di questo enzima: l'isoforma 5α R1 e l'isoforma 5α R2 (Andersson e Russell, 1990). E' stato dimostrato che l'isoforma 5α R2 si localizza negli oligodendrociti e negli astrociti del cervello di ratto ossia a livello delle strutture mielinizzate (Melcangi et al., 1988).

L'enzima 3α -idrossisteroide deidrogenasi (3α -HSD) catalizza infine la conversione del DHP in $3\alpha,5\alpha$ -tetraidroprogesterone (THP) tramite una reazione reversibile (Fig.1). Saggi di attività enzimatica hanno consentito di dimostrare che questo enzima, oltre ad essere espresso nel midollo spinale di ratto, è enzimaticamente attivo (Patte-Mensah et al., 2004).

L'enzima citocromo P450c17 è in grado di convertire il PREG in 17-idrossi-PREG e quest'ultimo steroide in deidroepiandrosterone (DHEA).

L'enzima 3β -HSD catalizza la conversione del DHEA in androstenedione precursore del testosterone (T) e dell'estrone (Fig.1). Il T è metabolizzato dalla 5α R in diidrotestosterone (DHT) mentre l'enzima 3α -HSD catalizza la reazione reversibile tra il DHT ed il 3α -diolo.

L'aromatasi (ARO) è l'enzima deputato alla conversione degli androgeni in estrogeni, infatti, converte l'androstenedione in estrone ed il T in estradiolo. Studi di immunostochimica hanno dimostrato che l'enzima ARO viene espresso dai neuroni del SNC di ratto ma non dalle cellule gliali (Lephart, 1996). Inoltre analisi biochimiche condotte su cervello di ratto hanno dimostrato che l'enzima ARO è attivo in tale sede (Roselli et al., 1985).

La presenza e l'attività degli enzimi in grado di convertire il PROG e il T nei loro derivati 5 α ridotti (il DHP e il DHT) e successivamente in quelli 5 α ,3 α -ridotti (il THP e il 3 α -diolo) è stata determinata anche a livello delle cellule di Schwann e nei nervi periferici di ratto (Melcangi et al., 1990).

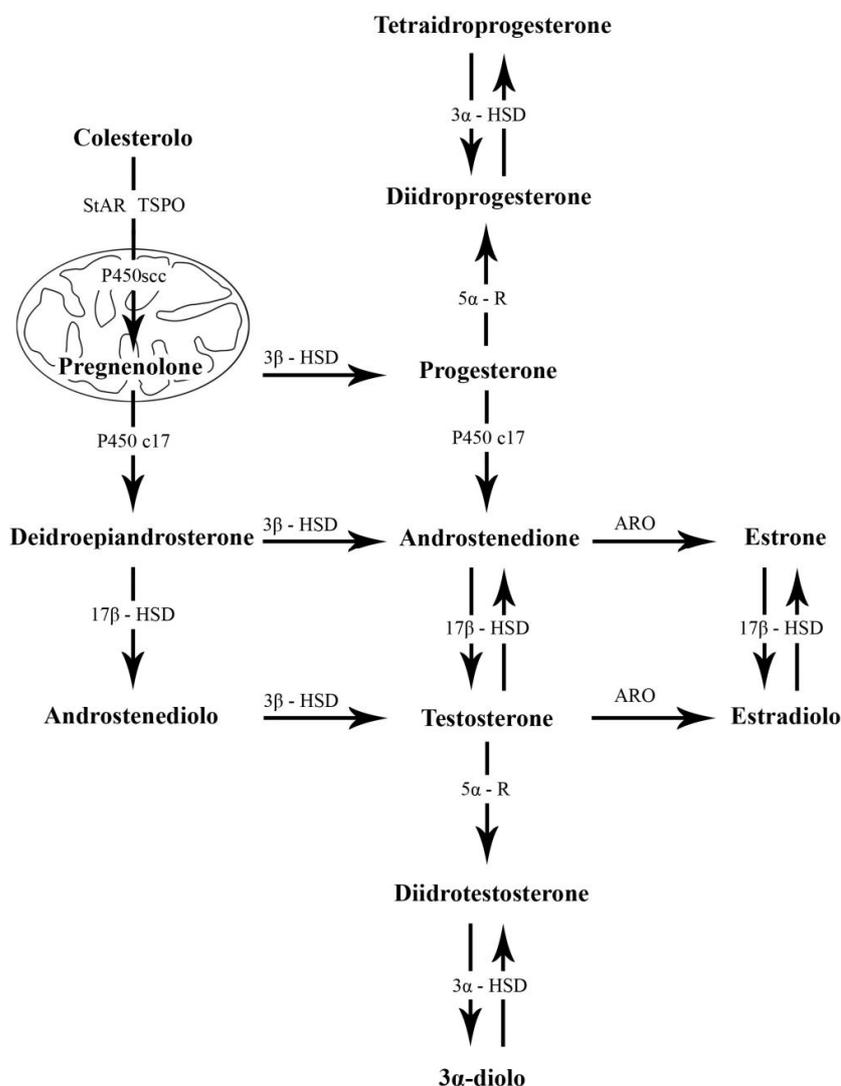


Fig.1 Biosintesi degli steroidi neuroattivi

1.4 Funzione degli steroidi neuroattivi

1.4.1 Dimorfismo sessuale

Tra individui di sesso femminile e maschile esistono evidenti differenze strutturali a livello di numerose aree dell'encefalo e del midollo spinale.

Tale dimorfismo sessuale del SNC viene regolato principalmente durante la vita fetale e nel periodo post-natale sia per opera degli steroidi derivanti dalle gonadi, che di quelli sintetizzati e convertiti direttamente nel SNC.

Ruolo di spicco nella regolazione del dimorfismo sessuale è assunto dal T e dai suoi metaboliti il DHT e l'estradiolo sintetizzati a livello del SNC grazie all'attività rispettivamente della 5 α R e dell'ARO. L'organizzazione strutturale del sistema nervoso dipende quindi dalla stretta collaborazione di androgeni ed estrogeni derivati dal T che agiscono a livello di recettori nucleari; infatti, il DHT lega il classico recettore nucleare degli androgeni (AR) mentre l'estradiolo è un ligando del recettore degli estrogeni (ER).

I tratti che contraddistinguono il genere maschile in specifiche regioni del midollo spinale e dell'encefalo sono regolati dal T e dal DHT. Tali tratti genere-specifici comprendono differenze nel numero, nella dimensione e nella morfologia di neuroni e cellule gliali, nella densità dei processi neuronali e gliali e nel numero di connessioni sinaptiche (Cooke et al., 1998, Morris et al., 2004).

1.4.2 Neuromodulazione

Anche nel sistema nervoso dell'adulto gli steroidi neuroattivi svolgono importanti funzioni.

Gli steroidi sono, infatti, in grado di modulare il rilascio dei neurotrasmettitori nonché l'espressione e la funzione dei loro recettori. Inoltre svolgono funzioni nella regolazione neuroendocrina e nel controllo del comportamento sessuale.

Il PROG per esempio è un antagonista del recettore sigma1 (Monnet et al., 1995) i cui ligandi selettivi esercitano un'azione a carico del sistema neurotrasmettitoriale eccitatorio, compreso il sistema glutammatergico e colinergico.

Il THP è un modulatore allosterico positivo del recettore GABA_A. L'attivazione di quest'ultimo aumenta la durata e la frequenza dell'apertura dei canali del cloro determinando iperpolarizzazione e ridotta eccitabilità della membrana neuronale (Majewska, 1992). La modulazione positiva del recettore GABA_A nel SNC determina quindi sedazione e ridotta ansietà (Mellon et al., 2001).

Il PREG solfato (PREGS) ed il DHEA solfato (DHEAS), invece, sono degli antagonisti del recettore GABA_A la cui inibizione provoca un aumento dell'eccitabilità e degli stati d'ansia (Majewska, 1992; Trojnar et al., 2002). Inoltre il PREGS è un agonista inverso del recettore sigma1 mentre il DHEAS svolge un'azione da agonista sullo stesso recettore (Monnet et al., 1995).

Gli steroidi neuroattivi possono anche esercitare la loro azione neuromodulatoria sui recettori serotoninergici, muscarinici, nicotinici, del kainato e della glicina (Maurice et al., 1999; Compagnone e Mellon, 2000; Stoffel-Wagner, 2001).

2. RUOLO DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SNP

2.1 Sintesi mielinica

Nel SNP le cellule di Schwann, deputate alla mielinizzazione assonale, rappresentano il principale target degli steroidi neuroattivi.

Nello specifico gli steroidi neuroattivi regolano l'espressione di due fondamentali proteine della mielina periferica: la proteina zero (P0) e la proteina della mielina periferica di 22 kDa (PMP22).

Studi condotti da Melcangi e collaboratori su colture di cellule di Schwann e sul nervo sciatico di ratto hanno evidenziato che il PROG, così come i suoi derivati DHP e THP, sono in grado di aumentare l'espressione di P0. Tuttavia l'espressione di PMP22 viene modulata solo dal THP (Melcangi et al., 1998, 2001a, 2001b).

Anche il T e i suoi metaboliti sono in grado di influenzare l'espressione delle suddette proteine. Infatti, esperimenti *in vitro* condotti su colture di cellule di Schwann di ratto hanno evidenziato che il trattamento con DHT o con 3 α -diolo determina un aumento nell'espressione genica rispettivamente di P0 e di PMP22 (Magnaghi et al., 1999; Melcangi et al., 2000a).

Inoltre l'espressione di P0 e di PMP22 diminuisce nel nervo sciatico di ratto in seguito a castrazione. Il trattamento con DHT o 3 α -diolo riporta l'espressione di P0 a livelli confrontabili con quelli del controllo mentre la riduzione di PMP22 viene contrastata solo mediante la somministrazione di 3 α -diolo (Magnaghi et al., 1999, 2004).

I risultati ottenuti in questi studi suggeriscono quindi che l'espressione della proteina P0 possa venire regolata sia dal recettore del progesterone (PR, su cui agiscono il PROG e il DHP) che dal recettore degli androgeni (AR, su cui agisce il DHT), mentre l'espressione di PMP22 potrebbe essere controllata da un recettore non classico come quello per il GABA_A (su cui agiscono il THP ed il 3 α -diolo) (Melcangi et al., 2005).

Gli steroidi neuroattivi sono anche in grado di modulare fattori di trascrizione coinvolti nel processo di mielinizzazione mediato dalle cellule di Schwann.

In particolare, il trattamento con PROG in colture di cellule di Schwann è in grado di regolare l'espressione di fattori di trascrizione quali Krox-20, Krox-

24, Egr-3 e FosB (Guennoun et al., 2001; Mercier et al., 2001), mentre soltanto il trattamento con DHP è in grado di stimolare il fattore Sox-10 (Magnaghi et al., 2007).

Studi *in vitro* condotti su co-culture di neuroni e cellule di Schwann hanno consentito di dimostrare che la sintesi mielinica viene regolata da un cross-talk tra cellule di Schwann e neuroni. Il PROG, legandosi al recettore PR presente nei neuroni, promuove l'espressione dei geni coinvolti in questo cross-talk stimolando la sintesi mielinica da parte delle cellule di Schwann (Rodriguez-Waitkus et al., 2003).

Gli steroidi neuroattivi sono quindi in grado di controllare il processo di mielinizzazione mediato dalle cellule di Schwann attraverso differenti meccanismi intracellulari.

Il PROG ed il T sono anche in grado di regolare indirettamente il grado di mielinizzazione del SNP stimolando la proliferazione delle cellule di Schwann (Svenningsen e Kanje, 1999). Infatti il PROG è in grado di aumentare la proliferazione delle cellule di Schwann in colture di nervo sciatico prelevato da ratti adulti o appena nati (Svenningsen e Kanje, 1999).

2.2 Neuroprotezione

Gli steroidi neuroattivi sono in grado di agire sia sui neuroni che sulla glia del SNP. Pertanto numerosi studi si sono focalizzati sul possibile effetto neuroprotettivo degli stessi in diverse condizioni patologiche e fisiologiche cui è soggetto il SNP.

L'invecchiamento è una situazione fisiologica che a livello dei nervi periferici si associa ad un'alterazione morfologica della guaina mielinica e alla diminuita sintesi delle proteine P0 e PMP22 (Azcoitia et al., 2003; Melcangi et al., 2003a). E' stato dimostrato che gli steroidi neuroattivi quali il PROG, il DHP e il THP sono in grado di aumentare l'espressione di tali proteine nel nervo sciatico di ratti in età avanzata migliorando al contempo le alterazioni morfologiche della guaina mielinica (Melcangi et al., 2000b, 2003a; Azcoitia, et al., 2003).

Nel SNP, inoltre, il trattamento con PREG, PROG e DHP è in grado di migliorare alterazioni morfologiche del nervo periferico causate da traumi da schiacciamento, resezione o criolesione aumentando i livelli d'espressione

genica di P0 e contrastando la riduzione dello spessore della guaina mielinica (Melcangi et al., 2000a; Koenig et al., 1995).

Oltre che sulla guaina mielinica, gli steroidi neuroattivi possono agire in modo specifico sugli assoni del SNP. Infatti, il trattamento con mifepristone, un antagonista del recettore del PROG, determina la riduzione del diametro assonale rispetto allo spessore della guaina mielinica e l'aumento della densità del neurofilamento a livello del nervo sciatico di ratto. Questo studio indica quindi che il PROG è coinvolto nel mantenimento dell'integrità strutturale dell'assone (Melcangi et al., 2003b).

Il trattamento con PROG o DHP è in grado di alleviare la neuropatia periferica indotta da docetaxel, contrastando le alterazioni a carico della velocità di conduzione nervosa (NCV) e della sensibilità termica nonché la degenerazione dei nervi sensitivi (Roglio et al., 2009).

Infine gli steroidi neuroattivi esercitano un effetto neuroprotettivo anche nella neuropatia periferica indotta da diabete.

L'insorgenza di neuropatia diabetica nel ratto correla con una significativa riduzione nel livello di steroidi neuroattivi nel nervo sciatico (Caruso et al., 2008a). Inoltre la gonadectomia determina un miglioramento della neuropatia diabetica e tale miglioramento correla con l'aumento di DHEA a livello del nervo sciatico (Pesaresi et al., 2011a). Tale osservazione ha condotto alla valutazione del potenziale effetto neuroprotettivo del DHEA nella neuropatia diabetica, dimostrando che la somministrazione dello steroide è in grado di riportare gli indicatori di neuropatia (i.e. ridotta NCV, sensibilità termica e densità delle fibre nervose sensitive) a valori confrontabili a quelli degli animali sani di controllo (Pesaresi et al., 2011b).

3. RUOLO DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI NEL SNC

E' ormai comprovato che le differenze nei livelli degli steroidi neuroattivi osservabili tra uomini e donne, siano in grado di influenzare differenze nell'incidenza e nella sintomatologia clinica di numerose patologie del SNC tra cui la Sclerosi Multipla (SM), l'Alzheimer (AD), il Parkinson (PD) e l'ischemia cerebrale (Melcangi e Garcia-Segura, 2010).

E' stato inoltre dimostrato in diversi modelli sperimentali che alcune patologie alterano in maniera sesso-specifica il livello degli steroidi neuroattivi nel SNC (Caruso et al., 2010; Giatti et al., 2010; Pesaresi et al., 2011a).

Da ultimo l'effetto neuroprotettivo degli steroidi neuroattivi può variare tra genere maschile e femminile.

Dunque gli steroidi neuroattivi giocano un ruolo fondamentale nel dimorfismo sessuale non solo in condizioni fisiologiche ma anche in condizioni patologiche.

3.1 Dimorfismo sessuale nelle patologie del SNC

Come in precedenza accennato, differenze nei livelli ormonali tra uomini e donne possono influenzare lo sviluppo di patologie come l'ischemia cerebrale, infatti, l'incidenza di eventi ischemici è maggiore negli uomini. Questa differenza è stata riscontrata anche in modelli animali di ischemia cerebrale in cui è stato dimostrato che gli estrogeni svolgono un ruolo protettivo negli animali di sesso femminile mentre, in animali di sesso maschile, gli androgeni contribuiscono ad aumentare il danno cerebrale che segue all'evento ischemico (Cheng et al., 2007; McCullough et al., 2003).

Anche l'incidenza del morbo di Parkinson (PD) è maggiore negli uomini rispetto alle donne; inoltre nelle donne l'età di esordio è più avanzata e la patologia progredisce più lentamente (Melcangi e Garcia-Segura, 2010). Differenze tra genere maschile e femminile sono state osservate anche nel modello animale di PD indotto mediante somministrazione di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) in cui si osserva una maggior deplezione di dopamina in topi di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile (Czlonkwska et al., 2006). E' stato inoltre dimostrato che, in un modello

sperimentale di PD indotto tramite somministrazione di 6-idrossidopamina, la degenerazione dei neuroni dopaminergici dipende dalla modulazione degli ormoni sessuali durante il ciclo estrale. Infatti, si osserva che l'induzione di PD determina una significativa riduzione dei neuroni dopaminergici quando effettuata durante il diestro (i.e. basso livello di estrogeni) mentre la presenza di elevati livelli sierici di estrogeni risulta neuroprotettivo (Datla et al., 2003). L'eccitotossicità è un fenomeno comune a numerose patologie del SNC come L'Alzheimer, il Parkinson e la Sclerosi Multipla.

L'azione eccitotossica dell'acido kainico (i.e. analogo del glutammato) su neuroni ippocampali, varia in base alla fase del ciclo estrale in ratti di sesso femminile. Nello specifico, la somministrazione dell'acido kainico all'inizio dell'estro (i.e. il giorno che segue al picco degli estrogeni) non determina morte neuronale. Tuttavia, quando la neurotossina viene somministrata durante il proestro (i.e. prima del picco di estrogeni), si osserva una riduzione significativa nel numero di neuroni ippocampali ad indicare l'azione neuroprotettiva mediata dagli estrogeni (Azcoitia et al., 1999).

Come accennato in precedenza, il livello degli steroidi neuroattivi nel SNC può essere a sua volta modulato dall'insorgenza di alcune patologie e tale alterazione può presentare un profilo sessualmente dimorfico.

Nel SNC di ratti (i.e. midollo spinale, cervelletto e corteccia cerebrale) affetti da diabete l'insorgenza della malattia determina una generale riduzione nel livello degli steroidi neuroattivi e tale modulazione differisce in base al sesso degli animali ed alla regione del SNC presa in esame (Pesaresi et al., 2011a, 2011b).

Infine l'effetto neuroprotettivo degli steroidi neuroattivi può differire tra i due sessi.

Studi *in vitro* condotti su colture di oligodendrociti di topo, hanno dimostrato che l'effetto protettivo mediato dal PROG e quello tossico del DHT è più spiccato in colture derivate da animali di sesso femminile rispetto a quelle di derivazione maschile (Swamydas et al., 2008).

Anche i neuroni mostrano dimorfismo sessuale in risposta agli ormoni steroidei. Somministrazioni ripetute di estradiolo sono in grado di modulare la neurogenesi dei neuroni ippocampali soltanto in roditori adulti di sesso

femminile mentre il T e il DHT stimolano la neurogenesi ippocampale solo in roditori di sesso maschile (Galea, 2008).

3.2 Neuroprotezione nelle patologie del SNC

Alcune patologie come la Sclerosi Multipla (SM), l'Alzheimer (AD), il Parkinson (PD) e l'ischemia cerebrale presentano dimorfismo sessuale nell'incidenza e nella loro progressione, suggerendo che tale dimorfismo sia imputabile al differente assetto ormonale presente tra uomini e donne.

Inoltre l'insorgenza di tali patologie determina a sua volta cambiamenti nel livello degli steroidi neuroattivi nel SNC.

Nel tessuto autoptico cerebrale isolato da pazienti affetti da SM, AD o PD sono state osservate variazioni nei livelli degli steroidi neuroattivi (Luchetti et al., 2011; Noorbakhsh et al., 2011).

Lo stesso tipo di evidenza è stata ottenuta in modelli animali di PD, di SM, di trauma cerebrale e di trauma del midollo spinale (Labombarda et al., 2006; Meffre et al., 2007; Caruso et al., 2010; Giatti et al., 2010; Melcangi et al., 2012).

Sulla base di queste osservazioni sono stati condotti numerosi studi atti ad indagare il potenziale effetto neuroprotettivo degli steroidi neuroattivi in diverse patologie del SNC.

Morbo di Alzheimer (AD)

L'eziopatogenesi del morbo di Alzheimer (AD) viene attribuita agli effetti neurodegenerativi mediati dall'accumulo cerebrale della proteina β -amiloide e della proteina Tau fosforilata, ritenute responsabili della formazione di placche e di aggregati neurofibrillari (Vajda, 2002).

In pazienti affetti da AD è stata evidenziata una significativa riduzione cerebrale di THP, DHEAS e di PREGS e tale riduzione è stata correlata con un'aumentata concentrazione della proteina β -amiloide suggerendo un possibile ruolo di tali steroidi neuroattivi nell'eziopatogenesi dell'AD (Weill-Engerer et al., 2002; Marx et al., 2006).

Basandosi su queste osservazioni, sono stati condotti studi pre-clinici su modelli animali di AD, al fine di valutare il potenziale effetto neuroprotettivo degli steroidi neuroattivi.

La somministrazione di THP nel modello triplo transgenico di AD (3×TgAD), è in grado di contrastare i deficit della memoria e dell'apprendimento aumentando la proliferazione dei progenitori neurali e preservando quindi l'abilità rigenerativa dell'encefalo (Wang et al., 2010). Inoltre, in topi di sesso femminile 3×TgAD la deplezione ormonale che segue ad ovariectomia aggrava il decorso della patologia. Il trattamento con estradiolo previene il declino cognitivo e la somministrazione ciclica di PROG riduce in modo significativo l'accumulo di β -amiloide ed incrementa gli effetti positivi dell'estradiolo (Carrol et al., 2010).

Morbo di Parkinson (PD)

L'insorgenza di Parkinson (PD) nell'uomo è dovuta principalmente alla ridotta attività dei neuroni dopaminergici ed alla conseguente neurodegenerazione che coinvolge la *pars compacta* della *substantia nigra* cerebrale (Tufekci et al., 2012).

Un recente studio condotto su un modello di PD in ratto ha confermato la correlazione presente tra questa patologia e il livello di steroidi neuroattivi nel SNC. In questo modello, infatti, la perdita di neuroni dopaminergici si associa ad una riduzione di PREG e DHP nello striato e ad un aumento di isopregnanolone nella corteccia cerebrale (Melcangi et al., 2012).

Il potenziale effetto neuroprotettivo degli steroidi neuroattivi è stato valutato sul modello di PD indotto mediante la somministrazione di MPTP.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di DHEA e di 17 β -estradiolo in topi affetti da PD, protegge i neuroni dopaminergici dello striato dalla neurotossina (D'Astous et al., 2003). Inoltre il PROG somministrato singolarmente o insieme al 17 β -estradiolo, è in grado di prevenire la deplezione dei neuroni dopaminergici (Morissette et al., 2008).

Infine, in diversi modelli animali di PD, è stato dimostrato che la somministrazione di androgeni quali il T e il DHT non è in grado di mediare alcun effetto neuroprotettivo (Bourque et al., 2009).

Ischemia cerebrale

L'importanza degli steroidi neuroattivi è stata dimostrata anche in modelli animali d'ischemia cerebrale indotta mediante occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion).

In questo modello il trattamento con PROG determina una riduzione del volume delle lesioni e della quantità di tessuto edematoso a livello encefalico. Tal effetto neuroprotettivo correla con la ridotta espressione genica di IL-1 β , TGF β e NOS-2 che sono invece up-regolati dalla MCAO (Gibson et al., 2005). E' stato inoltre dimostrato che il PROG riduce l'espressione proteica di Iba1 (i.e. marker microgliale) e di COX-2 (i.e. enzima pro-infiammatorio coinvolto nella citotossicità e nello stress ossidativo) che sono up-regolati nella corteccia cerebrale di ratti con MCAO. Se ne deduce che le proprietà neuroprotettive del PROG potrebbero essere mediate dalla sua capacità di inibire l'attivazione della microglia riducendo la neuroinfiammazione (Jiang et al., 2011).

Ishrat e collaboratori hanno dimostrato che, nel modello di MCAO, il PROG ed il THP contrastano l'aumentata permeabilità della barriera emato-encefalica (BEE), riducono l'estensione della zona infartuata e down-regolano la produzione di citochine pro-infiammatorie quali il TNF- α e l'IL-6 (Ishrat et al., 2010).

Anche il trattamento con T ha dimostrato effetti benefici nel modello di MCAO indotto in ratto. Il T determina, infatti, un precoce miglioramento del deficit neurologico dovuto all'evento ischemico e riduce il numero di astrociti ipertrofici intorno all'area infartuata (Pan et al., 2005).

Traumatic Brain Injury (TBI)

Il trattamento con PROG, T o estradiolo in un modello sperimentale di TBI riduce l'accumulo di astrociti proliferanti nella corteccia cerebrale danneggiata, evidenziando quindi che tali steroidi sono in grado di ridurre la gliosi reattiva conseguente al danno cerebrale (Garcia-Estrada et al., 1993). In seguito è stato dimostrato che il T riduce anche l'attivazione della microglia (i.e. riduzione nel numero di cellule MHC-II⁺) e che la conversione

di questo steroide nei suoi metaboliti (i.e. DHT e 17β -estradiolo) è alla base dell'effetto neuroprotettivo del T nel modello di TBI (Barreto et al., 2007).

Un recente studio ha infine dimostrato che la somministrazione di PROG migliora le performance cognitive e motorie inficiate dal trauma cerebrale riducendo il danno assonale e il numero di neuroni apoptotici (O'Connor et al., 2007).

Spinal cord injury (SCI)

Uno studio condotto da Labombarda e collaboratori ha dimostrato che, in seguito a transezione del midollo spinale (SCI), si verifica un aumento locale di PREG, PROG, DHP e THP. In particolare i livelli di PREG e PROG rimangono elevati nel midollo spinale di animali sottoposti a gonadectomia e adrenalectomia, indicando quindi che lo SCI induce un aumento nella biosintesi locale di PREG e la sua conversione in PROG (Labombarda et al., 2006).

Sulla base di queste evidenze, molti studi si sono focalizzati sull'utilizzo di modelli sperimentali di SCI al fine di indagare possibili approcci terapeutici basati sull'utilizzo di steroidi neuroattivi.

Il trattamento con PROG in un modello di SCI indotto in ratto stimola la proliferazione dei precursori degli oligodendrociti (i.e. OPC) ed il loro differenziamento in oligodendrociti maturi aumentando l'espressione di Olig2 e di Nkx2.2 (i.e. fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento degli OPC).

Il trattamento prolungato con PROG riduce il numero degli OPC, aumenta la quantità di oligodendrociti maturi esprimenti PLP ed up-regola Olig1 (i.e. fattore di trascrizione coinvolto nel riparo della mielina) indicando quindi che il PROG favorisce la rimielinizzazione nel modello di SCI (Labombarda et al., 2009).

Inoltre il PROG inibisce la proliferazione e l'attivazione di astrociti e cellule della microglia nel midollo spinale danneggiato, dimostrando quindi che tale steroide neuroattivo possiede un ruolo anti-infiammatorio (Labombarda et al., 2011). A sostegno di queste osservazioni, è stato dimostrato che il PROG riduce il volume delle lesioni midollari, attenua la reattività di astrociti e

microglia e riduce l'espressione di IL-1 β e di iNOS (inducibile Nitric Oxide Synthase) (Gibson et al., 2008).

4. SCLEROSI MULTIPLA

4.1 La Sclerosi multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del SNC a patogenesi autoimmune caratterizzata da demielinizzazione e danno assonale che determinano deficit di carattere motorio, sensoriale e cognitivo.

La SM colpisce la sostanza bianca del midollo spinale, dell'encefalo e del cervelletto causando in acuto un danno di tipo infiammatorio caratterizzato da distruzione della guaina mielinica e in cronico cicatrizzazione gliale.

Il primo a descrivere la SM fu Jean Cruveilhier (1791-1873) nell'Atlante di Anatomia Patologica pubblicato tra il 1829 e il 1842. Cruveilhier individuò una malattia che sintomatologicamente si manifestava con stanchezza e paraplegia e che si distingueva per la presenza di cicatrici a livello del midollo spinale localizzate soprattutto nel tratto cervicale.

La remissione transitoria dei sintomi tipica della forma recidivante-remittente della SM fu descritta da Frerichs che definì tale patologia col termine Hirnsclerose: Sclerosi Multipla.

Nel 1863 Leyden definì i principali aspetti della SM allora conosciuti: la maggior frequenza nelle donne rispetto agli uomini (25:1), l'insorgenza intorno al ventesimo anno di vita, la rarità di casi ereditari e l'esposizione al freddo e a traumi quali fattori eziopatogenetici (Raine et al., 2008).

La prima descrizione completa della SM spetta a Jean Marie Charcot (1825-1893) che identificò lesioni caratterizzate da gliosi reattiva, da perdita di mielina e dalla presenza di fagociti infarciti di acidi grassi. Inoltre Charcot ipotizzò che la SM fosse il risultato di infezioni acute mediate da agenti patogeni come il vaiolo, il tifo e il colera (Raine et al., 2008).

Rindfleisch enfatizzò la natura infiammatoria della SM e postulò la teoria vascolare, documentando la presenza d'infiltrati cellulari perivascolari.

A oggi, ancora molto ci sfugge riguardo all'eziologia, la patogenesi e la progressione della SM anche se molte informazioni sono state ottenute grazie all'introduzione dell'uso di modelli animali (Raine et al., 2008).

4.1.1 Epidemiologia

La SM è una patologia relativamente diffusa con un'incidenza di 2-3,6/100.000 nuovi casi all'anno in tutto il mondo, incidenza analoga a quella riscontrata in Italia (Young, 2011; Alonso e Hernàn, 2008).

La SM è una malattia multifattoriale che insorge con maggior frequenza tra la seconda e la quarta decade di vita, con un picco d'incidenza intorno ai 30 anni di età. Tuttavia il 2% degli affetti sviluppa SM prima dei 10 anni d'età mentre sono stati descritti casi di SM con insorgenza in età avanzata (Sospedra et al., 2005).

La SM colpisce prevalentemente le donne rispetto agli uomini con rapporto donna/uomo di 2:1. Tuttavia gli uomini presentano forme più rapidamente ingravescenti delle donne (Hemmer et al., 2002).

La prevalenza della SM sembra aumentare in modo proporzionale all'aumento dei gradi di latitudine in entrambi gli emisferi (Ahlgren et al., 2011). La SM affligge soprattutto le popolazioni dell'Europa del nord e il tasso di prevalenza della SM tra le popolazioni dei bianchi non europei è la metà rispetto a quella delle popolazioni del nord dell'Europa. L'influenza dei fattori ambientali e geografici sull'incidenza di malattia è confermata anche dal fatto che la SM si sviluppa con maggior frequenza nei Paesi dell'Occidente e in particolare nelle zone urbanizzate rispetto a quelle rurali (Loeb e Favale, 2003. SEU).

Il rischio di sviluppare SM è maggiore per i parenti di primo grado di pazienti affetti da SM. Infatti, l'incidenza di SM nella popolazione generale è pari a circa lo 0,1%-0,2%, mentre l'incidenza aumenta tra fratelli (3%), genitori (2%) e figli (2%) (Ahlgren et al., 2011). Inoltre, la ricorrenza tra fratelli gemelli è la più alta essendo pari al 35% per i gemelli omozigoti e al 2-5% per i gemelli dizigoti (Sadovnick et al., 1993). Oltre ai fattori ambientali, alla base della SM esiste quindi anche una predisposizione genetica.

Inoltre, in coloro che sono predisposti allo sviluppo della SM, la suscettibilità è correlata anche all'esposizione ad agenti infettivi virali come il virus del morbillo, l'HTLV1, il Simian Virus, l'Herpes Virus 6 e l'EBV ma anche ad agenti infettivi batterici come la *Chlamydia Pneumoniae* (Compston et al., 2002). Un elemento degno di nota è rappresentato dal fatto che la SM colpisce soprattutto soggetti che vivono in buone condizioni igienico-sanitarie e che quindi verosimilmente non verranno a contatto con tali agenti patogeni durante l'infanzia ma in età più avanzata in accordo con l'età tipica di esordio della SM.

I dati epidemiologici possono essere interpretati con due diverse modalità. Secondo l'ipotesi della "polio" gli anticorpi acquisiti nei primi anni di vita ridurrebbero la probabilità che l'antigene raggiunga il SNC riducendo così anche l'incidenza di sviluppo delle infezioni virali sintomatiche del SNC. Secondo l'ipotesi della "prevalenza" la SM sarebbe più frequente nelle zone in cui i patogeni coinvolti in tale malattia sono maggiormente diffusi (Raine et al., 2008).

4.1.2 Eziopatogenesi

L'insorgenza della SM è il risultato dell'interazione tra componente genetica e componente ambientale.

I geni coinvolti nella SM non hanno un'ereditarietà di tipo mendeliano e la SM sembra essere una malattia poligenica in cui i geni responsabili non sono mutati e non codificano per un prodotto aberrante ma presentano dei normali polimorfismi (Compston et al., 1999). Ogni polimorfismo dà il suo contributo allo sviluppo di alcuni tratti complessi tipici della SM (Compston et al., 2002).

Studi di linkage suggeriscono l'esistenza di una possibile associazione tra il rischio di sviluppare la SM e gli alleli MHC-II DR15 e DQ6. L'aplotipo più frequentemente coinvolto nella razza caucasica sembra essere l'antigene leucocitario umano (HLA) DR2 e nello specifico gli aplotipi DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 (Oksenberg et al., 2004). Altri geni candidati comprendono geni codificanti per proteine d'adesione (i.e. VICAM), recettori

immunitari, chemochine, citochine (i.e. TNF- α , IL-7), fattori di crescita e geni strutturali dell'unità mielina-oligodendrocita (Gourraud et al., 2012).

La componente ambientale sembra essere rappresentata da infezioni virali, probabilmente mediate da diversi agenti patogeni in grado di scatenare una risposta autoimmune aberrante contro diversi antigeni mielinici tramite un meccanismo di molecular mimicry (Prat e Antel, 2005).

I meccanismi responsabili dell'insorgenza e dello sviluppo della SM non sono stati ancora del tutto chiariti, tuttavia vi sono diverse evidenze che permettono di classificare la SM tra le patologie autoimmuni.

In primo luogo la sopracitata correlazione tra SM e alcuni alplotipi MHC-II. In secondo luogo la sintesi intratecale d'immunoglobuline osservata nei pazienti con SM e infine l'efficacia di terapie immunomodulanti o immunosoppressive (Goodin et al., 2002).

Pertanto nei pazienti con SM sono stati studiati l'assetto del sistema immunitario e l'istologia delle placche di demielinizzazione. Tali studi hanno consentito di dimostrare che, nell'eziopatogenesi della SM, il sistema immunitario svolge un ruolo centrale.

Sia nell'esordio che nella progressione della patologia, vi è un coinvolgimento dell'immunità innata che comprende diverse popolazioni cellulari (i.e. cellule dendritiche, cellule natural killer e microglia) in grado di attivare i linfociti T (Gandhi et al., 2010).

Inoltre un ruolo fondamentale è svolto dall'immunità adattativa e, nello specifico, dai linfociti pro-infiammatori Th1 e Th17 e dalle cellule Treg che, nei pazienti affetti da SM, sembrano avere una minore funzionalità. A livello delle lesioni cerebrali di pazienti affetti da SM, sono stati individuati linfociti T CD8⁺ i quali sembrano svolgere un ruolo nella progressione di malattia (Loma e Heyman, 2011).

Anche i linfociti B sembrano essere coinvolti nella patogenesi della SM rilasciando le immunoglobuline che sono comunemente rilevate nel liquor dei pazienti (Duddy et al., 2007). Inoltre, a livello delle placche di demielinizzazione, è stata evidenziata la presenza di specifiche frazioni del complemento attivate da anticorpi (Storch et al., 1998).

Il meccanismo patogenetico più avvalorato prevede che l'insorgenza della SM sia dovuta a un iniziale evento degenerativo che porterebbe antigeni del SNC o derivanti da patogeni residenti nel SNC a raggiungere in periferia i linfonodi e la milza.

Qui gli antigeni sarebbero processati e presentati tramite molecole MHC I e II dalle APC (Antigen Presenting Cells) a linfociti T CD4⁺ e CD8⁺. Si determinerebbe quindi l'espansione clonale linfocitaria e l'acquisizione delle funzioni effettrici.

A questo punto i linfociti migrerebbero fino al SNC dove riconoscerebbero peptidi mielinici presentati da microglia e macrofagi su molecole MHC-II. Una volta riattivati nel SNC, i linfociti comincerebbero a rilasciare citochine, chemochine e anticorpi in grado di richiamare in sede i macrofagi. Anche i neuroni, le cellule gliali e la microglia attivata sembrano partecipare allo sviluppo di un microambiente pro-infiammatorio nel SNC (Sospedra et al., 2005).

L'infiltrazione delle cellule infiammatorie sarebbe facilitata dall'aumento della permeabilità della BEE dovuta alle metallo proteasi (MMP) rilasciate da mastociti e macrofagi e all'aumentata espressione di molecole d'adesione a livello dell'endotelio capillare (Yong et al., 2007).

Una volta rimosso l'antigene target dal sito d'infiammazione, le cellule del sistema immunitario innato e adattativo andrebbero incontro ad apoptosi a cui seguirebbe l'attivazione dei meccanismi di riparo del danno che, nella SM, consistono nella rimielinizzazione (McFarland et al., 2007).

Un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria del SNC è svolto da un complesso network di citochine e chemochine.

Le citochine sono tradizionalmente classificate in pro-infiammatorie, quali ad esempio l'IFN- γ (Interferone gamma) e il TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) e anti-infiammatorie, quali l'IL-4 (interleuchina 4), l'IL-10 e il TGF- β (Tumor Growth Factor-beta) (Woodroffe, 1995). E' stato dimostrato che le fasi iniziali della SM sono caratterizzate da un aumento delle citochine pro-infiammatorie e dalla diminuzione di quelle anti-infiammatorie (Navikas e Link, 1996).

Particolare importanza rivestono anche le chemochine, una popolazione eterogenea di molecole in grado di regolare l'attivazione e la migrazione di cellule immunocompetenti. A livello delle placche di soggetti con SM o in modelli animali di SM, è stata osservata la presenza delle chemochine RANTES e IP-10 e dei loro recettori CCR5 e CXCR3 (Hvas et al., 1997; Jiang et al., 1998; Sørensen et al., 1999).

4.1.3 Quadri clinici

I sintomi della SM sono il risultato dell'azione di cellule effettrici del sistema immunitario che si attivano contro auto-antigeni come la proteina basica della mielina (MBP), causando demielinizzazione e danno assonale.

Il target del sistema immunitario nella SM è rappresentato dagli oligodendrociti che formano la guaina mielinica che avvolge gli assoni nel SNC. La guaina mielinica è costituita dalle membrane cellulari degli oligodendrociti che rivestono gli assoni formando un multistrato e consentendo la trasmissione rapida del potenziale d'azione.

La demielinizzazione dell'assone determina quindi la riduzione della velocità di trasmissione del segnale.

La SM presenta un'ampia gamma di segni e sintomi. I sintomi presentati da pazienti affetti da SM comprendono sindromi motorie, sensoriali e disfunzioni cognitive.

L'evento più drammatico che determina una sindrome motoria è lo sviluppo di mielite acuta che, danneggiando la via motoria discendente, porta ad ipostenia. L'ipostenia può colpire qualsiasi estremità, singolarmente o in combinazione. Inoltre la spasticità è uno stato frequente nella SM ed è potenzialmente disabilitante.

I più comuni sintomi sensoriali sono l'intorpidimento, le parestesie in una o in entrambe le gambe, le disestesie e il dolore. Si osservano poi disfunzioni a carico della visione come la diplopia.

Infine le sintomatologie cognitive comprendono la comparsa di sintomi psichiatrici come la depressione, il sonno, le vertigini e l'epilessia.

Le sedi colpite dalla patologia sono l'encefalo, i nervi cranici, il cervelletto, il tronco encefalico, il nervo ottico, il midollo spinale, le vie motorie e le vie di senso.

Il coinvolgimento dell'encefalo determina l'alterazione di funzioni cognitive quali l'attenzione, la memoria visuo-spaziale e la capacità di calcolo che sono spesso compromesse già all'esordio di malattia. Negli stadi avanzati di malattia non è raro riscontrare demenza sottocorticale (Chiaravalloti e De Luca, 2008).

Il coinvolgimento dei nervi cranici può manifestarsi con nevralgia trigeminale, paralisi di un emivolto, ipoacusia (i.e. diminuzione dell'udito) e vertigini soggettive (Kahana et al., 1973).

Le lesioni cerebellari si manifestano con nistagmo (i.e. movimento oscillatorio del globo oculare), atassia nella marcia (i.e. perdita della coordinazione muscolare), tremore, dismetria degli arti (i.e. difficoltà nel compiere piccoli movimenti) e disartria (i.e. difficoltà nell'articolazione delle parole). I casi di coinvolgimento del cervelletto sono meno frequenti rispetto a quelli in cui le lesioni colpiscono encefalo e midollo spinale ma, quando la SM si presenta con un quadro clinico di questo tipo, la prognosi è generalmente negativa (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill).

Le lesioni a carico del tronco encefalico determinano la comparsa di diplopia (i.e. sdoppiamento dell'immagine), oftalmoplegia internucleare e nistagmo dell'occhio.

Il nervo ottico è la sede più frequentemente coinvolta all'esordio di malattia. Infatti, nel 25% dei casi la SM esordisce con la neurite ottica retro bulbare (NORB), caratterizzata da acuta riduzione del *visus* monolaterale.

Il midollo spinale è frequentemente coinvolto nei quadri di esordio della SM. Sintomi tipici sono la paraparesi (i.e. paresi degli arti inferiori), la riduzione e la scomparsa dei riflessi addominali, l'iper-reflessia e il segno di Babinski positivo. Quando si ha il coinvolgimento del tratto cervicale del midollo spinale, un segno caratteristico è il fenomeno di Lhermitte (Loeb e Favale, 2003. SEU).

Le lesioni a carico delle vie motorie si manifestano con ipostenia (i.e. debolezza muscolare) e con diversi tipi di paresi (mono-, emi- o tetraparesi)

che variano secondo la sede di lesione. L'ipostenia diventa un sintomo presente nella quasi totalità dei pazienti in fase avanzata di patologia e non è raro il riscontro d'ipertono spastico (Loeb e Favale, 2003. SEU).

Le lesioni a carico delle vie di senso si manifestano con la comparsa di parestesia (i.e. sensazione di formicolio) che presenta localizzazione variabile in base alla sede coinvolta: sovra-midollare o midollare. La progressione di malattia è caratterizzata dall'insorgenza di ipoestesie (i.e. diminuzione della sensibilità) e alterazioni della sensibilità profonda soprattutto di quella vibratoria degli arti inferiori.

La maggior parte dei sintomi con cui si manifesta la SM non sono specifici della malattia, ma sono riconducibili a lesioni nel SNC e riflettono il coinvolgimento della sostanza bianca.

La neurite ottica e l'oftalmoplegia internucleare sono i segni che più comunemente permettono di fare diagnosi di SM mentre i sintomi autonomici sono meno frequentemente associati alla SM e, in questi casi, è necessaria un'elevata esperienza per fare diagnosi di SM (Raine et al., 2008). La diagnosi certa di SM è quindi di complessa determinazione considerando anche l'eterogeneità della sintomatologia stessa presentata al primo episodio.

4.1.4 Decorso e Prognosi

La SM mostra eterogeneità anche nel decorso clinico.

Esistono, infatti, differenti forme di SM: la forma Recidivante-Remittente (SM-RR), la forma Secondaria-Progressiva (SM-SP), la forma Primaria-Progressiva (SM-PP), la forma Benigna (BSM) e la Sindrome Clinicamente isolata (CIS).

La forma di SM-RR è quella che si presenta con maggior frequenza (85%) ed è caratterizzata dall'alternanza tra periodi di benessere (i.e. remissione) e ricadute di malattia (i.e. recidive) (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill).

Si definisce "ricaduta clinica" la manifestazione di un deficit neurologico che duri almeno 24 ore e tenda a regredire spontaneamente nell'arco di giorni o settimane. La frequenza e la durata delle ricadute non sono predicibili così come non lo è la durata del periodo di remissione. Per "ricaduta radiologica" s'intende la comparsa di nuove lesioni in risonanza magnetica nucleare

(RMN) senza che il paziente presenti alcun tipo di sintomatologia (Loeb e Favale, 2003. SEU). Nella maggior parte dei casi, durante il periodo di remissione, il paziente recupera il deficit che aveva acquisito con la ricaduta, ma nel tempo è possibile che tale recupero sia solo parziale con conseguente accumulo di disabilità che possono determinare l'evoluzione della SM-RR in SM-SP (Nylander e Hafler, 2012). Si stima che entro i 19-20 anni dall'esordio, la maggior parte delle forme di SM-RR si converta in SM-SP (Rovaris et al., 2006).

La SM-SP è caratterizzata dal continuo peggioramento delle condizioni del paziente. Talvolta possono manifestarsi anche delle recidive sia cliniche che radiologiche ed in tal caso la patologia prende il nome di SM-SP con ricadute (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill).

La SM primariamente progressiva (SM-PP) è la forma meno frequente ed interessa il 10% dei pazienti. Già dall'esordio la malattia si presenta progressivamente ingravescente, con accumulo di disabilità e peggioramento delle condizioni generali in assenza di episodi di acuzie vera e propria (Miller e Leary, 2007). Questa forma di malattia colpisce solitamente pazienti di età avanzata (intorno ai 40 anni) ed è caratterizzata da un neuroimaging che mostra una malattia con un carico lesionale stabile e spesso scarso (Miller e Leary, 2007).

La forma BSM è caratterizzata da un basso numero di recidive, lunghi periodi di remissione e quindi scarso accumulo di deficit neurologici con prognosi favorevole (Winder e Achiron, 2011).

La CIS è definita come una manifestazione clinica e radiologica compatibile con la diagnosi di malattia demielinizzante ma che non può ancora essere considerata SM perché non soddisfa i criteri di disseminazione spaziale e temporale (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill). I pazienti con CIS hanno un elevato rischio di sviluppare la SM, ma la CIS può rimanere anche un episodio isolato.

La Sclerosi Multipla è una patologia polimorfa anche dal punto di vista della prognosi.

Mentre l'aspettativa di vita non si discosta da quella di individui sani di medesima razza e sesso, la qualità della vita è spesso inficiata dall'accumulo

di disabilità; infatti, a 10 anni dall'esordio, il 30-40% dei pazienti necessita di un appoggio monolaterale o bilaterale mentre il 10% dei pazienti non è più in grado di deambulare (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill).

Sono considerati fattori prognostici positivi il sesso femminile, l'età d'esordio intorno ai 25 anni, la presenza di sintomi sensitivi e di NORB all'esordio, un basso numero di ricadute durante i primi anni di malattia ed un basso grado di disabilità a 5 anni dall'esordio.

Al contrario fattori prognostici negativi sono considerati il sesso maschile, l'esordio in età avanzata, un esordio polisintomatico o con sintomi cerebellari, l'elevata frequenza di ricadute, un accumulo di disabilità durante i primi anni di malattia e la comparsa di un decorso di tipo progressivo (Bergamaschi, 2007).

La SM non causa direttamente il decesso dei pazienti, ma la morte può insorgere per l'insorgenza di complicanze come la comparsa di infezioni polmonari, cutanee e urinarie con sepsi diffusa che portano ad insufficienza respiratoria secondaria (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill).

4.1.5 Anatomia patologica

La demielinizzazione a carico dell'encefalo o del midollo spinale determina la formazione delle placche tipiche della SM.

Le placche acute o attive si presentano di color rosa ed hanno la tendenza a confluire in un'unica placca. Dal punto di vista istologico la placca attiva è caratterizzata da ampia demielinizzazione, gliosi reattiva, presenza d'infiltrati infiammatori, deposito di proteine plasmatiche, edema e alterazione della BEE. Quest'ultima è diagnosticabile mediante Risonanza Magnetica (RMI) con somministrazione di gadolinium, un elemento paramagnetico che extravasa laddove la BEE presenta dei punti di lassità (Lucchinetti et al., 2000). In alcune placche attive il numero di oligodendrociti diminuisce fortemente mentre in altre si mantiene costante. Solitamente la perdita cellulare è maggiore a livello del *core* della placca piuttosto che in periferia, dove talvolta è possibile osservare un aumento nel numero di oligodendrociti. All'interno della placca si possono trovare anche sottili fibre mielinizzate che suggeriscono un tentativo di rimielinizzazione (Raine et al., 2008).

Le placche croniche o inattive si presentano come lesioni circoscritte di colore grigio e indurite. La loro presenza nell'encefalo determina l'allargamento dei ventricoli e la contrazione del corpo calloso, della sostanza bianca profonda, della corteccia e, talvolta, della sostanza grigia dei nuclei profondi. Nel midollo spinale la presenza di placche croniche causa atrofia contribuendo alla debilitazione del paziente (Compston et al., 2002).

Da un punto di vista istologico nelle placche croniche possono essere presenti diversi gradi di preservazione della mielina (Compston et al., 2002). La flogosi si riduce e si ha proliferazione astrocitaria con espansione della lesione in senso centrifugo. Ai bordi residua un infiltrato di linfociti, macrofagi e plasmacellule che progressivamente si riduce fino a scomparire. Inoltre nelle placche inattive si osservano perdita degli oligodendrociti e gliosi reattiva (McFarlin e McFarland, 1982). E' inoltre possibile osservare fenomeni di rimielinizzazione aberrante e incompleta con proliferazione dell'oligodendrogliia durante le prime fasi del danno (Chang et al., 2002).

4.1.6 Terapia

I farmaci utilizzati nella SM hanno come fine il trattamento delle ricadute, la loro prevenzione e il rallentamento della progressione.

Per le fasi iniziali della malattia esistono terapie almeno in parte efficaci nel contrastare la flogosi e le ricadute cliniche ma purtroppo non sono ancora disponibili trattamenti in grado di arrestare o rallentare significativamente la progressione della patologia e l'accumulo di disabilità.

4.1.6.a Trattamento delle ricadute

Metilprednisolone e prednisone

Per i pazienti in recidiva di malattia è indicata la terapia steroidea con metilprednisolone ad alto dosaggio (500-1000mg/die). Il metilprednisolone viene somministrato per via endovenosa per 3-7 giorni, a cui segue un trattamento con prednisone (60-80mg/die) quando la sintomatologia è particolarmente severa (Sellebjerg et al., 2005).

La terapia steroidea accorcia i tempi di recupero clinico ma non influenza l'outcome neurologico della ricaduta e non è in grado di prevenire le successive ricadute (Goodin et al., 2002).

La breve durata del trattamento steroideo ne limita però gli effetti collaterali che regrediscono spontaneamente alla sospensione del trattamento.

4.1.6.b Prevenzione delle ricadute e rallentamento della progressione

I farmaci efficaci nel ridurre la frequenza di ricadute e nel ridurre il progressivo accumulo di disabilità appartengono a due classi farmacologiche: gli immunomodulanti e gli immunosoppressori.

Farmaci Immunomodulanti

INF- β 1

L'INF- β 1 è in grado di ridurre la migrazione di cellule infiammatorie nel SNC, di inibire la proliferazione dei linfociti T e la produzione di citochine pro-infiammatorie, di stimolare la produzione di citochine anti-infiammatorie e di ridurre l'espressione di molecole MHC sulle cellule presentanti l'antigene a livello del SNC (Yong et al., 1998).

Per il trattamento della SM si possono utilizzare sia l'INF- β 1a che l'INF- β 1b somministrati per via intra-muscolare (i.m.) o sotto-cutanea (s.c.). L'INF- β 1a viene isolato da mammiferi mentre l'INF- β 1b viene sintetizzato da batteri tramite la tecnica del DNA ricombinante.

Avonex® (INF- β 1a, i.m., 30 μ g/settimana) ha dimostrato la sua efficacia nel diminuire il numero di recidive cliniche e radiologiche, nel ridurre il carico lesionale (i.e. dimensioni delle lesioni in RMN) e nel rallentare la progressione di malattia (Simon et al., 1996; Rudick et al., 2001).

Rispetto agli altri interferoni, Rebif® (INF- β 1a, s.c., 22/44 μ g, 3 volte alla settimana) risulta ugualmente efficace nel diminuire il numero di ricadute cliniche e strumentali annue ma possiede un'efficacia maggiore nel ridurre la progressione di malattia (PRISMS Study Group, 1998; Li e Paty, 1999).

Infine, Betaferon è l'unico interferone efficace nel ridurre l'accumulo di disabilità in pazienti con SM-SP (Goodin et al., 2002).

L'IFN- β 1b somministrato alla dose di 250 μ g riduce del 34% l'incidenza di recidive cliniche, dell'82% quella di ricadute radiologiche e del 17% il carico lesionale. Inoltre si è riscontrata una ridotta progressione della disabilità sebbene tale risultato non sia statisticamente significativo (Neurology,1993. 43:655–661; Neurology,1995. 45:1277-1285).

Glatiramer acetato (GA, Copaxone®)

Il Glatiramer acetato (GA) è costituito da polipeptidi sintetici che mimano la struttura della MBP.

Il GA, legando le molecole MHC, è in grado di competere con gli antigeni mielinici nella presentazione ai linfociti T e genera una risposta immunitaria GA-specifica. I linfociti T specifici per GA sono nella maggior parte dei casi di tipo Th2 e, migrando nel SNC, determinano la soppressione del processo infiammatorio e secernono fattori neurotrofici come il BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Schrempf e Ziemssen, 2007).

Trials clinici hanno dimostrato che la somministrazione di GA (s.c., 20 mg/die) ha un'efficacia paragonabile a quella degli interferoni nelle forme di SM-RR, anche se gli effetti terapeutici del farmaco si manifestano dopo sei mesi dall'inizio della terapia (Johnson et al., 1995, 1998).

Natalizumab

Il Natalizumab è un anticorpo monoclonale ed è il farmaco più frequentemente utilizzato nelle forme aggressive di SM.

Il meccanismo d'azione è basato sulla sua capacità di legare selettivamente l' α 4 β 1, un'integrina espressa sulla superficie dei linfociti T attivati, e di impedire il legame di questi ultimi con le cellule endoteliali interferendo quindi con la loro migrazione nel SNC (Steinman, 2005).

Studi clinici documentano che la somministrazione di Natalizumab (300 mg, ogni 4 settimane) è in grado di ridurre il numero di recidive con un'efficacia pari a circa il doppio rispetto a quella degli interferoni e del GA (Miller et al., 2003).

Il trattamento con Natalizumab può determinare l'insorgenza di gravi reazioni allergiche nell'1% dei pazienti; per tal motivo questo farmaco è

indicato solo in quei pazienti che, nonostante la terapia immunomodulante, abbiano avuto almeno due recidive cliniche/strumentali oppure nei casi di SM ad esordio aggressivo e con spiccata disabilità (Polman et al., 2006).

Fingolimod (FTY 720)

Il Fingolimod è una molecola di sintesi in grado di modulare il recettore per la sfingosina-1-fosfato (S1P) che si trova sulla superficie dei linfociti T.

Il Fingolimod agisce come un antagonista funzionale dei recettori S1P bloccando la capacità dei linfociti T di uscire dai linfonodi (Chun e Hartung, 2010).

Lo studio clinico FREEDOM ha dimostrato che il trattamento con Fingolimod (os, 0,5mg/die) riduce il tasso di ricadute annuo, riduce il carico lesionale e rallenta la progressione di malattia (Devonshire et al., 2012). Per questi motivi l'uso di Fingolimod è stato approvato come farmaco di prima linea per la SM.

Tuttavia, dati i molteplici effetti collaterali, molti ricercatori consigliano di avvalersi di questa opzione terapeutica solo dopo il parziale o completo fallimento della terapia immunomodulante, riservandosi il ricorso a trattamenti immunosoppressivi come terza linea (Cohen et al., 2010).

Molteplici studi hanno evidenziato la necessità di cominciare precocemente la terapia immunomodulante. Infatti, quanto più tardivamente viene ridotta la frequenza di ricadute e quindi rallentata la progressione di malattia, tanto più precocemente si verificheranno accumulo di disabilità ed il conseguente declino delle funzioni cognitive (Jacobs et al., 2000; Comi et al., 2001).

Farmaci immunosoppressori

Azatioprina (Aza)

L'azatioprina (Aza) è un antagonista del metabolismo delle purine in grado di inibire la sintesi di acidi nucleici e proteine e risulta particolarmente attiva nelle cellule a elevato metabolismo come i linfociti T attivati (Suthanthiran et al., 1996).

L'Aza (os, 2-3mg/kg, die) è indicata soprattutto nelle forme di SM-SP. Studi clinici che dimostrano una significativa efficacia dell'Aza sono scarsi ma l'utilizzo di questo farmaco trova giustificazione nella sua buona tollerabilità, nella possibilità di somministrazione orale e nel basso costo (Goodin et al., 2002).

Mitoxantrone

Il mitoxantrone possiede attività citotossica contro linfociti B e T ed è in grado di ridurre i livelli di citochine pro-infiammatorie circolanti. Questo farmaco (5-12mg/m², ogni tre mesi) è indicato nelle forme di SM-RR e di SM-SP ad andamento aggressivo, con elevato numero di ricadute e accumulo di disabilità (Goodin et al., 2002).

Poiché il mitoxantrone è cardiotossico e può provocare una forma di leucemia acuta, il suo impiego nel trattamento della SM si sta lentamente abbandonando (Hartung et al., 2002).

4.2 Steroidi Neuroattivi e dimorfismo sessuale nella SM

Come affermato in precedenza, la Sclerosi Multipla (SM) è una patologia caratterizzata da dimorfismo sessuale. Infatti l'incidenza, la progressione e la gravità della SM variano tra individui di sesso maschile e femminile (Melcangi e Garcia-Segura, 2010).

Tale dimorfismo potrebbe essere dovuto a fattori genetici e a differenze nella risposta immunitaria sesso-correlata, ma si ritiene che la differenza nei livelli di steroidi sessuali presente tra uomini e donne possa giocare un ruolo determinante (Giatti et al., 2010; Melcangi e Garcia-Segura, 2010).

Numerose osservazioni cliniche hanno contribuito a sostenere tale ipotesi.

In donne affette da SM è stato osservato, infatti, che condizioni fisiologiche caratterizzate da modificazioni nei livelli plasmatici degli steroidi sessuali (i.e. il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa) sono in grado di alterare il decorso della patologia.

Studi osservazionali hanno evidenziato per esempio che subito prima l'inizio del mestruo, ossia in corrispondenza di ridotti livelli di estrogeni e PROG, avviene un peggioramento sintomatologico della SM (El-Etr et al., 2005).

Pozzili e collaboratori hanno inoltre dimostrato che in donne affette da SM esiste una correlazione tra il livello plasmatico degli steroidi durante il ciclo mestruale e il grado di lesioni nel SNC. Nello specifico è stata evidenziata un'associazione significativa tra la riduzione nei livelli di PROG e un'aumentata estensione delle lesioni cerebrali (Pozzili et al., 1999).

Il ruolo della gravidanza nel decorso clinico della SM è stato chiarito grazie al trial clinico PRISM (PRegnancy In Multiple Sclerosis). Questo studio ha coinvolto 254 donne affette da SM ed ha dimostrato che, durante il terzo trimestre di gravidanza, il tasso medio di ricadute si riduce mentre durante i primi tre mesi che seguono al parto, tale tasso aumenta superando addirittura quello osservato nell'anno precedente la gravidanza.

Da un punto di vista immunologico tal evento si spiega facilmente poiché la gravidanza è caratterizzata dall'inibizione dell'immunità cellulo-mediata a favore della risposta immunitaria umorale con uno shift Th1-Th2. Tal evento produce quindi una remissione sintomatologica spontanea in una patologia autoimmune Th1-mediata quale la SM.

La gravidanza risulta però associata anche ad un aumento nei livelli di PROG ed estrogeni che possono avere un ruolo positivo nello spostare l'ago della bilancia a favore della risposta Th2-mediata e nel favorire i processi di rimielinizzazione (Vukusic e Confavreux, 2006).

L'insorgenza della SM stessa può determinare cambiamenti nei livelli plasmatici degli steroidi sessuali.

Uno studio condotto su pazienti di sesso maschile affetti da SM, ha evidenziato una riduzione nei livelli basali di LH (ormone luteinizzante), di FSH (ormone follicolo stimolante) e di testosterone (T) accompagnata dall'assenza di responsività delle gonadotropine al GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine). Tale studio ha dunque dimostrato che l'insorgenza di SM provoca una disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Safarinejad et al., 2008).

Inoltre esiste una correlazione tra il carico lesionale osservato in RMN in pazienti affetti da SM-RR e la concentrazione sierica di ormoni sessuali. Infatti, nelle donne l'incremento di lesioni attive correla con una riduzione

nei livelli di T, mentre negli uomini il carico lesionale è correlato positivamente con la concentrazione di estradiolo (Tomassini et al., 2005).

Queste osservazioni hanno incoraggiato numerosi ricercatori a indagare il possibile effetto neuroprotettivo esercitato dagli ormoni steroidei in diversi modelli animali di SM e su pazienti affetti da SM.

4.3 Steroidi Neuroattivi e neuroprotezione nella SM

La maggior prevalenza della SM nelle donne rispetto agli uomini e la riduzione nel tasso di ricadute osservato durante la gravidanza sostengono un potenziale ruolo degli ormoni sessuali nella patogenesi e nella terapia della SM.

Il trattamento farmacologico per la SM attualmente si basa sulla somministrazione di farmaci anti-infiammatori ed immunomodulanti che sono parzialmente in grado di rallentare la progressione della patologia e l'accumulo di disabilità. L'obiettivo dei ricercatori è dunque quello di individuare nuovi composti in grado di rallentare o prevenire i processi che, inducendo danno assonale e neurodegenerazione, portano a deficit cognitivi. L'estriolo, steroide neuroattivo che raggiunge un picco di concentrazione durante l'ultimo trimestre di gravidanza, rappresenta uno dei principali candidati nella terapia della SM poiché possiede proprietà immunomodulanti e neuroprotettive (Gold e Voskuhl, 2009).

Al fine di ricreare le condizioni protettive della gravidanza, è stato condotto uno studio clinico pilota su donne affette da SM cui è stato somministrato estriolo (8mg/die) per un totale di 10 mesi. Il trattamento con estriolo riduce il numero e il volume delle lesioni osservabili tramite RMN e aumenta le funzioni cognitive nelle pazienti con SM-RR. Tuttavia le donne affette da SM-SP non mostrano alcun beneficio dal trattamento (Sicotte et al., 2002).

Come puntualizzato definitivamente nello studio PRISM, durante il periodo che segue il parto, si osserva un aumento nel tasso di ricadute cliniche nelle donne affette da SM. Questa fase è caratterizzata da una drastica riduzione nei livelli di estrogeni e progesterone e da uno shift Th2-Th1 della risposta immunitaria (Vukusic e Confavreux, 2006).

Sulla base delle evidenze cliniche, nel 2005 è partito lo studio POPART'MUS (Prevention of Post-Partum Relapses in Multiple Sclerosis) che è stato esteso in Italia nel 2007 ed è tuttora in corso d'opera.

Questo trial è stato disegnato con lo scopo di prevenire le ricadute *post-partum* tramite la co-somministrazione di un derivato del PROG (Nomegestrol Acetato) e di estradiolo. Il progestinico viene somministrato a dosi elevate (10mg/die) in modo da raggiungere concentrazioni plasmatiche confrontabili a quelle osservate durante la gravidanza; la combinazione con basse dosi di estradiolo (75µg, 1 volta a settimana) si rende necessaria al fine di evitare atrofia dell'endometrio dovuta al progestinico. Fino ad ora lo studio si è dimostrato sicuro e privo di significativi eventi avversi (Vukusic et al., 2009). Infine è stato dimostrato che in pazienti di sesso maschile affetti da SM-RR il trattamento con T (100mg, 12 mesi) determina un rallentamento dei processi che portano ad atrofia cerebrale ed un miglioramento nelle capacità cognitive (Sicotte et al., 2007).

5. ENCEFALOMIELITE AUTOIMMUNE SPERIMENTALE

5.1 L'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale

L'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE) rappresenta il modello di SM più utilizzato ed è caratterizzato da infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione a livello del SNC.

Si ritiene che nel 1885 Louis Pasteur sia stato il primo a indurre l'encefalomielite sperimentale durante gli studi condotti sul vaccino antirabbico (Kipp et al., 2012). Tra il 1894 e il 1914 il virus della rabbia venne propagato in coniglio dal cui midollo spinale fu preparato il vaccino antirabbico (Kipp et al., 2012). Purtroppo, l'iniezione ripetuta di tale vaccino, determinò in alcuni soggetti l'insorgenza di paralisi e, nei casi più gravi, il decesso. L'esame anatomico patologico consentì di identificare la presenza di infiammazione e demielinizzazione a livello di encefalo e midollo spinale, stimolando i ricercatori a condurre ulteriori studi su modelli animali.

Thomas Rivers fu il primo a dimostrare che la paralisi indotta immunizzando alcune scimmie tramite encefalo di coniglio si associava alla presenza di

infiltrati infiammatori perivascolari e di demielinizzazione nel SNC (Rivers et al., 1933). Inoltre, fu sempre Rivers a dare una definizione di tale patologia infiammatoria acuta identificandola con il termine di encefalomielite ed evidenziando l'esistenza di una correlazione con le patologie infiammatorie demielinizzanti dell'uomo (Kipp et al., 2012).

Tale definizione nel corso degli anni fu modificata in encefalomielite allergica sperimentale e successivamente in encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) (Mix et al., 2010).

Quando fu ipotizzato il coinvolgimento della risposta immunitaria nell'insorgenza dell'EAE i ricercatori, tra cui Kabat, tentarono di aumentare la stimolazione del sistema immunitario mediante l'uso dell'adiuvante di Freund in grado di garantire un rilascio controllato e prolungato dell'emulsione encefalitogenica oltre a possedere esso stesso un'azione pro-infiammatoria (Kabat et al., 1947). Grazie a tale adiuvante per indurre l'EAE divenne sufficiente eseguire un'unica iniezione dell'emulsione encefalitogenica. Inoltre, l'utilizzo dell'adiuvante di Freund cui fu in seguito associata la somministrazione del *mycobacterium tuberculosis*, consentì di ottenere un decorso sintomatologico caratterizzato dall'alternanza di ricadute e fasi di remissione.

Tali studi contribuirono alla nascita del modello sperimentale SM più utilizzato: l'EAE (Mix et al., 2010).

5.2 Modelli animali di Sclerosi Multipla

Purtroppo non esiste un unico modello animale in grado di riassumere in se tutte le caratteristiche di una patologia tanto eterogenea come la SM. Per tal motivo sono stati utilizzati differenti specie animali e numerosi protocolli di immunizzazione.

L'utilizzo di modelli animali si è reso necessario al fine di comprendere i potenziali meccanismi eziopatogenetici alla base della SM e per studiare l'efficacia di terapie in modelli preclinici in grado di riprodurre i principali aspetti neuroimmunologici e istopatologici della malattia.

I diversi modelli animali di SM differiscono in base all'agente utilizzato per indurre la patologia. Esistono modelli virali, modelli di demielinizzazione indotta da agenti tossici, modelli transgenici e modelli immunologici.

5.2.1 Modelli virali

Molte infezioni virali che colpiscono il SNC hanno aspetti anatomo-patologici simili a quelli osservati nella SM.

Il modello virale più noto che riproduce i principali aspetti della SM è quello indotto dal virus TMEV (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus).

Nel 1934 Theiler osservò che l'infezione da virus TMEV determinava lo sviluppo di una forma di paralisi flaccida nei topi. Oggi è noto che tale virus è un patogeno capace di indurre demielinizzazione in ceppi murini sensibili (Mix et al., 2010).

TMEV induce una patologia che può essere monofasica o bifasica. La forma monofasica è rappresentata dall'insorgenza di meningo-encefalomielite transitoria che si spegne gradualmente in circa tre settimane. Nella forma bifasica, invece, al picco di malattia segue una fase di remissione e successivamente una fase di cronicizzazione.

Durante il picco di malattia si osserva neurodegenerazione mentre la fase di cronicizzazione è caratterizzata dalla comparsa di lesioni demielinizzanti localizzate a livello del midollo spinale (Tsunoda e Fujinami, 2010). La demielinizzazione osservata nel midollo spinale è dovuta alla persistenza del virus negli oligodendrociti e nei macrofagi spinali (Kipp et al., 2012).

Ad oggi anche il virus dell'epatite murina e il virus delle foreste Semliki sono utilizzati per indurre forme di encefalomielite che mimano il decorso della SM (Mix et al., 2010).

Il virus dell'epatite murina (MHV) induce la formazione di un'encefalite acuta mediata da linfociti T CD8⁺ (Kipp et al., 2012). Inoltre l'inoculazione intracranica di ceppi neurotrofici del virus MHV determina lo sviluppo di un modello di neurite ottica che ha consentito di valutare l'efficacia di nuove terapie per la NORB, un sintomo frequente nella SM (Shindler et al., 2008).

L'infezione da SFV (virus delle foreste Semliki) provoca un'encefalite letale o a decorso iperacuto che differisce dal tipico decorso cronico della SM-RR.

Tuttavia, questo modello di infezione virale risulta utile per lo studio delle interazioni cellula-cellula che sono alla base dei processi di demielinizzazione tipici della SM (Fragkoudis et al., 2009). L'utilizzo di tale modello ha consentito infatti di determinare che l'infezione da SFV induce l'espressione di antigeni nel SNC che determinano la lisi degli oligodendrociti mediata da linfociti T CD8⁺ (Kipp et al., 2012).

5.2.2 Modelli di demielinizzazione mediati da tossici

Diversi sono i composti in grado di causare demielinizzazione a livello del SNC e tra questi troviamo alcune sostanze come l'etidio bromuro, l'endotossina batterica ed alcuni autoanticorpi specifici per proteine della mielina. Tuttavia tali agenti esercitano la loro azione tossica solo quando somministrati direttamente nel SNC, motivo per cui sono poco utilizzati (Kipp et al., 2009).

I modelli di demielinizzazione indotta da lisolectina sono tra i più diffusi (Kipp et al., 2012). La lisolectina è un attivatore della fosfolipasi A₂ in grado di indurre la formazione di aree di demielinizzazione focale quando iniettata nel midollo spinale (Denic et al., 2011). La demielinizzazione è dovuta all'azione tossica del detergente sugli oligodendrociti e sulla guaina mielinica. Il modello che si ottiene tramite iniezione di lisolectina è un modello acuto di SM, infatti, dopo circa cinque settimane dall'induzione, si osserva un completo processo di rimielinizzazione (Denic et al., 2011).

Il cuprizone è un chelante del rame che, a differenza della lisolectina, è in grado di provocare demielinizzazione anche quando somministrato per via orale (Kipp et al., 2009). Sospendendo la somministrazione di cuprizone s'innescano meccanismi di riparo della mielina (Denic et al., 2011). Tuttavia prolungando la somministrazione del chelante per un periodo di almeno 12 settimane, si determina un danno cronico con fallimento dei processi di rimielinizzazione analogamente a quanto accade nei pazienti affetti da SM (Kipp et al., 2012).

5.2.3 Modelli transgenici

Lo sviluppo di topi transgenici ha permesso di migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della SM.

Modelli knock-out per proteine della mielina, per esempio, hanno consentito di studiare il ruolo della risposta immunitaria verso specifici antigeni mielinici.

Topi knock out per MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) o topi wild-type immunizzati mediante mielina non esprime la proteina MOG, sono in grado di sviluppare solamente una forma acuta di encefalomielite. Dunque la risposta autoimmune verso la proteina MOG è necessaria allo sviluppo della forma cronica della patologia (Kipp et al., 2012).

Il trasferimento di cellule T CD4⁺ specifiche per il peptide MBP¹⁻⁹ (Myelin Basic Protein) determina lo sviluppo di EAE in ceppi murini suscettibili. Partendo da quest'osservazione è stato generato il primo modello transgenico murino esprime linfociti T con un TCR (T Cell Receptor) specifico per il peptide encefalitogenico MBP¹⁻⁹.

Successivamente sono stati sviluppati modelli murini transgenici esprimenti TCR specifici per PLP o per MOG. L'espressione di specifici TCR è risultata sufficiente a determinare lo sviluppo dell'EAE (Kipp et al., 2012).

Inoltre, la produzione di topi esprimenti diversi alplotipi HLA associati alla SM ha permesso di studiare il coinvolgimento di tali molecole nello sviluppo dell'encefalomielite. Sono stati infatti prodotti topi transgenici esprimenti TCR specifici per HLA-DR2a, HLA-DR4 e HLA-A3 tutti alplotipi coinvolti nello sviluppo della SM.

Infine sono stati generati animali knock-out o knock-in per mediatori della neuroinfiammazione al fine di valutarne il contributo nella patogenesi dell'encefalomielite. Ad esempio è stato prodotto un modello murino di encefalomielite esprime alti livelli di TNF α nei neuroni, negli astrociti e negli oligodendrociti (Kipp et al., 2012).

5.2.4 Modello immunitario: L'EAE

L'EAE può essere indotta mediante immunizzazione attiva o passiva.

L'EAE attiva è indotta tramite la somministrazione di un omogenato di midollo spinale o di proteine mieliniche (i.e. MOG, MBP o PLP) in adiuvante di Freund. Al fine di indurre un ulteriore burst immunologico alcuni ceppi murini e di ratto necessitano anche dell'iniezione di *Mycobacterium tuberculosis* inattivato (Mix et al., 2010).

Questo tipo di immunizzazione determina l'attivazione e l'espansione clonale di linfociti T specifici per gli antigeni encefalitogenici i quali, una volta attraversata la BEE, riconoscono elementi della mielina come estranei inducendo quindi lo sviluppo dell'EAE (Denic et al., 2011).

L'EAE passiva è indotta mediante il trasferimento di linfociti T CD4⁺ isolati da organi linfoidi secondari di animali a loro volta affetti da EAE attivamente indotta. Questi linfociti vengono riattivati *in vitro* contro l'antigene encefalitogenico utilizzato per indurre l'EAE nel donatore e successivamente vengono re-infusi in un animale sano. La possibilità di indurre l'EAE secondo tale modalità fu dimostrata per la prima volta nel 1981 e consentì di chiarire definitivamente la natura autoimmunitaria dell'EAE (Ben Nun et al., 1981).

Il decorso clinico dell'EAE può essere sia acuto che cronico.

Nel modello acuto di EAE la malattia raggiunge un punto massimo di gravità clinica (i.e. picco clinico) andando poi incontro a remissione completa della sintomatologia neurologica.

Nel modello cronico di EAE, una volta raggiunto il picco clinico, la sintomatologia neurologica migliora ma la patologia si cronicizza.

Il modello acuto di EAE non possiede molte delle caratteristiche tipiche delle malattie autoimmuni come la SM e per tale motivo viene spesso utilizzato come modello di encefalomielite acuta disseminata (ADEM).

La forma cronica di EAE, invece, può essere caratterizzata dall'alternanza di ricadute e fasi di remissione sintomatologica con un decorso molto simile a quanto si osserva nelle forme di SM-RR (Kipp et al., 2012).

5.3 L'EAE nel ratto

A differenza del modello murino, l'EAE nei ratti può essere indotta mediante la somministrazione dell'antigene encefalitogenico senza bisogno di un ulteriore stimolo immunologico (Swanborg et al., 2001).

Tra i diversi ceppi di ratto, i Lewis sono i più utilizzati come modello di SM.

I ratti Lewis vengono immunizzati con MBP o con uno dei suoi peptidi encefalitogenici emulsionati in adiuvante di Freund completo (CFA). La patologia che ne deriva è una forma acuta di EAE in cui il raggiungimento del picco clinico è seguito dalla remissione permanente dei sintomi neurologici. Inoltre in questo modello non si osserva demielinizzazione, caratteristica tipica della SM, e questo ne rappresenta un limite.

A differenza dei ratti Lewis, i ratti Dark Agouti (DA) possono sviluppare anche una forma di EAE con decorso cronico caratterizzata dall'alternanza tra fasi di remissione e fasi di ricaduta sintomatologica (Lorentzen et al., 1995).

5.3.1 L'EAE nel ratto Lewis

Per indurre l'EAE nei ratti Lewis sono sufficienti basse dosi di MBP (5-50µg/Kg) da somministrare in presenza di CFA (Swanborg et al., 2001).

I ratti Lewis sviluppano una forma di EAE acuta o monofasica caratterizzata dalla formazione di estese zone di infiammazione nel midollo spinale, nel tronco cerebrale e nel cervelletto. Tuttavia la demielinizzazione non è una caratteristica tipica di questo modello.

E' stato osservato che tra l'induzione e il raggiungimento del picco clinico di malattia si verifica un aumento di linfociti T CD4⁺ e CD3⁺ a livello del midollo spinale. Durante la fase di remissione sintomatologica si osserva invece l'apoptosi delle cellule T encefalitogeniche nel SNC e un aumento delle cellule Treg (Ishigami et al., 1998; Almolda et al., 2011).

E' noto che l'IFN- γ e il TNF- α svolgono un ruolo cruciale nell'induzione dell'EAE nel ratto Lewis, mentre l'IL-10 ed il TGF β -1 sono le citochine maggiormente responsabili del decorso monofasico della malattia (Tanuma et al., 1997). La produzione di INF- γ induce l'espressione di molecole di adesione sull'endotelio dei vasi nel SNC favorendo la penetrazione dei

linfociti T encefalitogenici e dei macrofagi attraverso la BEE. Successivamente le cellule T CD4⁺ soppressorie si attivano e, rilasciando TGF- β , down-regolano l'espressione di IFN- γ e di TNF- α (Stevens et al., 1994). L'attivazione dell'endotelio cerebrovascolare mediata dall'IFN- γ viene quindi inibita dal TGF- β prevenendo un'ulteriore infiltrazione infiammatoria nel SNC e favorendo l'inibizione della risposta immunitaria ed il miglioramento della sintomatologia neurologica (Swanborg et al., 2001).

Il modello acuto di EAE indotto nei ratti Lewis è ben caratterizzato ed offre quindi la possibilità di individuare strategie terapeutiche per la fase acuta della SM caratterizzata da un elevato grado di neuroinfiammazione.

Tuttavia questo modello non consente di indagare i meccanismi alla base della progressione e della cronicizzazione della SM.

5.3.2 L'EAE nel ratto Dark Agouti

I ratti Dark Agouti (DA) sono un ceppo suscettibile allo sviluppo dell'EAE e, secondo il protocollo d'immunizzazione utilizzato, possono sviluppare sia una forma acuta che una forma cronica (RR-EAE) della patologia.

Al fine di indurre la forma acuta dell'EAE, nei ratti DA è utilizzata MBP in adiuvante di Freund completo (CFA) (Swanborg et al., 2001).

Per indurre la forma cronica dell'EAE, invece, si utilizza un omogenato di midollo spinale singenico in adiuvante di Freund incompleto (IFA) (Lorentzen et al., 1995; Beeton et al., 2007). Inoltre nei ratti DA l'EAE può essere indotta anche tramite la somministrazione di PLP a basso dosaggio (Swanborg et al., 2001).

Nei ratti DA i primi sintomi neurologici cominciano a manifestarsi intorno al decimo giorno dall'immunizzazione (pi) e peggiorano gradualmente fino a raggiungere un massimo di gravità (i.e. picco clinico) intorno al giorno 14pi.

Nella forma RR-EAE, dopo il raggiungimento del picco clinico, la sintomatologia decresce in severità e fasi di remissione si alternano a fasi di ricaduta sintomatologica che proseguono almeno fino al giorno 40pi. Inoltre, nei ratti DA affetti da RR-EAE, non si osserva mai un completo recupero funzionale.

Inizialmente gli animali sviluppano paralisi flaccida della coda cui segue la comparsa di una paresi ingravescente degli arti che procede in senso postero-anteriore (Lorentzen et al., 1995).

La prima caratterizzazione anatomo-patologica dell'EAE indotta in ratti DA è stata condotta da Lorentzen e collaboratori nel 1995. Al giorno 14pi si osserva la presenza d'infiltrati infiammatori perivascolari costituiti da linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ e da cellule esprimenti il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e di classe II. Negli stadi precoci della patologia (i.e. giorno 10-13pi) l'infiammazione perivascolare risulta associata a lesioni attive della mielina mentre, durante gli stadi più avanzati dell'EAE (i.e. giorni 23-32pi), risulta preponderante la presenza di placche inattive di demielinizzazione (Lorentzen et al., 1995).

Le lesioni attive nei ratti DA sono caratterizzate da degenerazione degli oligodendrociti e alterazione della guaina mielinica, infiltrazione di linfociti, granulociti e macrofagi e precipitazione di IgG, a indicare la compromissione della BEE. Gli assoni sono raramente ridotti in numero.

Le lesioni inattive, invece, sono caratterizzate da perdita degli oligodendrociti e presenza di zone confluenti di demielinizzazione. Gli infiltrati infiammatori sono costituiti prevalentemente da macrofagi contenenti tracce di IgG e frammenti di mielina intracellulari. Inoltre si evidenzia una significativa riduzione nella densità assonale soprattutto a livello della colonna dorsale del midollo spinale. Le lesioni più profonde si osservano a livello del midollo spinale mentre, nella sostanza bianca del cervelletto e nel tronco cerebrale, le lesioni sono ridotte (Lorentzen et al., 1995).

L'elevata suscettibilità dei ratti DA allo sviluppo dell'EAE sembra essere dovuta a diversi fattori tra cui il ridotto tasso di apoptosi dei linfociti T autoreattivi nei tessuti target (Lukic et al., 2001) e il precoce afflusso di macrofagi al SNC (Mensah-Brown et al., 2011).

Rispetto a ceppi resistenti all'EAE, nel SNC dei ratti DA si verifica un aumento di molecole costimolatorie in grado di indurre l'espressione di fattori anti-apoptotici da parte delle cellule T autoreattive, determinandone l'aumento della sopravvivenza (Lukic et al., 2001). Inoltre, l'inibizione dei macrofagi durante l'induzione dell'EAE previene lo sviluppo della patologia

suggerendo che l'elevata suscettibilità dei ratti DA all'EAE sia dovuta, almeno in parte, al precoce afflusso di macrofagi nel SNC (Mensah-Brown et al., 2011).

Nei DA durante il primo picco di malattia si osserva un aumento nell'espressione di citochine pro-infiammatorie nel midollo spinale tra cui il TNF- α , l'IL-6 e l'IL-12 e una riduzione nell'espressione di citochine anti-infiammatorie tra cui l'IL-10 e il TGF- β 1 (Tanuma et al., 2000; Thessen et al., 2009).

Dunque l'azione combinata d'infiltrati macrofagici, linfociti T e citochine pro-infiammatorie sembra essere responsabile della demielinizzazione e del danno assonale che contribuiscono alla cronicizzazione della malattia nei ratti DA (Tanuma et al., 2000).

L'EAE indotta in ratti DA rappresenta il modello più accurato per lo studio dei meccanismi patogenetici alla base della SM-RR e per la ricerca di nuove terapie farmacologiche (Chun et Hartung, 2010).

5.4 Steroidi Neuroattivi e dimorfismo sessuale nell'EAE

L'insorgenza dell'EAE può determinare alterazioni nel livello degli steroidi neuroattivi sia nel plasma che nel SNC degli animali.

E' stato dimostrato che in ratti DA affetti da EAE il livello di steroidi neuroattivi nel midollo spinale, nel cervelletto e nella corteccia cerebrale subisce delle variazioni rispetto agli animali sani. Tali variazioni si manifestano già dal giorno 14pi e differiscono in base al sesso dei ratti e in base alla regione del SNC presa in considerazione. Nello specifico è stato osservato che i livelli di DHP, THP, isopregnanolone, DHT e 3 α -diolo sono modificati nel SNC in maniera sessualmente dimorfica. Inoltre i cambiamenti osservati a livello plasmatico non riflettono quelli osservati nel SNC ad indicare che l'insorgenza dell'EAE determina specifici cambiamenti della neurosteroidogenesi e del metabolismo nel SNC (Giatti et al., 2010).

Al fine di considerare anche le fasi più avanzate della patologia, è stato condotto un successivo esperimento sul modello di EAE indotto in ratti DA (Caruso et al., 2010). I risultati ottenuti mostrano che anche al giorno 40pi si osserva una variazione sesso-correlata nel livello degli steroidi neuroattivi.

Infatti in questo modello i livelli di PREG, DHP, T, DHT e 3 α -diolo subiscono una significativa riduzione nel midollo spinale soltanto in ratti di sesso maschile. Inoltre, la modulazione osservata al giorno 40pi (Caruso et al., 2010) risulta per molti aspetti differente da quanto evidenziato durante le fasi precoci di malattia (i.e. 14pi; Giatti et al., 2010).

Questi studi hanno quindi dimostrato che l'insorgenza dell'EAE ha un impatto sui livelli degli steroidi neuroattivi nel SNC che differisce in base al sesso degli animali, alla fase della patologia e all'area del SNC presa in esame.

E' possibile ipotizzare quindi che il dimorfismo sessuale osservato tra uomini e donne affetti da SM possa essere connesso a specifiche differenze nella modulazione degli steroidi neuroattivi al livello del SNC (Giatti et al., 2010; Caruso et al., 2010).

5.5 Steroidi Neuroattivi e neuroprotezione nell'EAE

Date le proprietà immunomodulanti, mielinizzanti e neuroprotettive di alcuni steroidi neuroattivi, sono stati condotti numerosi studi preclinici al fine di valutarne i potenziali effetti benefici nel trattamento dell'EAE.

5.5.1 Androgeni nell'EAE

La somministrazione orale di testosterone (T) in ratti maschi affetti da EAE è in grado di ridurre l'incidenza della patologia e di aumentare i livelli sierici di corticosterone. Inoltre il T *in vitro* inibisce la proliferazione di cellule mononucleari isolate dagli animali affetti da EAE. Questo studio dimostra quindi che, agendo su specifiche risposte immunitarie cellulo-mediate, il T è in grado di alterare lo sviluppo dell'EAE (Maccio, 2005).

Matejuk e colleghi hanno dimostrato che il pre-trattamento con T in topi C57BL/6 maschi previene quasi totalmente lo sviluppo dell'EAE. Il T inibisce la proliferazione di linfociti T specifici per l'antigene encefalitogenico MOG₃₅₋₅₅ e riduce la secrezione di TNF- α ed INF- γ . Tali effetti sono inibiti dalla somministrazione di flutamide, un antagonista del recettore degli androgeni (AR), indicando quindi che gli effetti regolatori del T sono mediati dalla sua azione su questo recettore (Matejuk et al., 2005).

Come affermato in precedenza, il T può essere aromatizzato in estradiolo quindi il suo effetto può essere mediato sia dal recettore AR che dal recettore degli estrogeni (ER). Il DHT (i.e. metabolita del T) agisce solo sul recettore AR. Il trattamento con DHT è in grado di ridurre la gravità sintomatologica dell'EAE sia in topi SJL che in topi C57BL/6 (Dalal et al., 1997; Palaszynski et al., 2004). Inoltre, linfociti T autoreattivi isolati da topi SJL trattati con DHT producono livelli di IL-10 significativamente più alti rispetto a quelli isolati da topi trattati solo con veicolo. I risultati ottenuti da questi due studi indicano quindi che parte degli effetti neuroprotettivi e anti-infiammatori esercitati dal T sull'EAE vengono mediati dall'azione del suo metabolita DHT sul recettore AR (Dalal et al., 1997; Palaszynski et al., 2004).

5.5.2 Estrogeni nell'EAE

Partendo dal rapporto tra SM e stato gravidico, Ito e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con 17β -estradiolo è in grado di migliorare il decorso clinico dell'EAE in topi di sesso femminile, riducendo l'infiltrato infiammatorio e la secrezione di TNF α nel SNC (Ito et al., 2001).

Il trattamento con 17β -estradiolo ed estriolo determina un miglioramento nella sintomatologia clinica dell'EAE che si associa alla riduzione nel numero e nella dimensione dei foci infiammatori a livello del SNC. Inoltre, linfociti T isolati da animali trattati con tali steroidi neuroattivi mostrano uno shift da una risposta di tipo Th1 alla risposta anti-infiammatoria di tipo Th2 (Bebo et al., 2001).

Matejuk e collaboratori hanno approfondito lo studio delle proprietà anti-infiammatorie del 17β -estradiolo. Il 17β -estradiolo si è dimostrato in grado di inibire l'espressione genica di chemochine (i.e. RANTES, MIP-1 α , MIP-2, IP-10 e MCP-1), di recettori chemochinici (i.e. CCR1 e CCR5) e di citochine infiammatorie (i.e. IFN- γ e TNF- α) nel midollo spinale di topi affetti da EAE. Il miglioramento clinico dell'EAE che segue al trattamento con 17β -estradiolo sembra quindi dipendere dalla capacità di tale steroide neuroattivo nel ridurre il reclutamento leucocitario nel SNC (Matejuk et al., 2001).

Infine, il trattamento con estriolo può essere efficace anche su modelli di EAE indotti in animali di sesso maschile. La somministrazione di estriolo,

infatti, riduce la gravità sintomatologica e la produzione di citochine pro-infiammatorie (i.e. IFN γ , TNF α , IL-2 e IL-6) nei topi di sesso maschile così come in quelli di sesso femminile affetti da EAE (Palaszynski et al., 2004).

5.5.3 Progesterone nell'EAE

Anche l'effetto del PROG è stato studiato nel modello di EAE.

La somministrazione di PROG effettuata prima di indurre l'EAE in topi C57BL/6 di sesso femminile migliora il decorso clinico della patologia riducendo l'infiltrato infiammatorio e l'area di demielinizzazione a livello del *funiculus* dorsale e ventrale del midollo spinale (Garay et al., 2007). Inoltre il trattamento con PROG contrasta la riduzione nell'espressione della subunità $\alpha 3$ della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica, riduzione che si osserva in seguito all'induzione di EAE. (Garay et al., 2007).

In seguito è stato dimostrato che il trattamento con PROG consente di preservare la densità assonale e di ridurre le alterazioni morfologiche (i.e. formazione di sferoidi) e l'accumulo di APP osservati negli assoni spinali di topi affetti da EAE (Garay et al., 2009).

Infine il pretrattamento con PROG riduce la reattività della microglia, preserva la densità degli oligodendrociti maturi, compromessa negli animali affetti da EAE, ed aumenta l'espressione genica di MBP e PLP dimostrando di poter contrastare la demielinizzazione (Garay et al., 2012).

Il PROG non ha solo un effetto preventivo ma possiede anche un'efficacia terapeutica nell'EAE. Il trattamento con PROG in topi C57BL/6 affetti da EAE ne determina un miglioramento sintomatologico associato all'aumentata secrezione di citochine anti-infiammatorie e alla ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie. Nel midollo spinale degli animali trattati con PROG si osserva inoltre una ridotta espressione genica di recettori citochinici e chemochinici accompagnata dalla riduzione di infiltrato infiammatorio (Yates et al., 2010).

Dunque il PROG possiede proprietà immunoregolatorie, mielinizzanti e neuroprotettive che, nel modello acuto di EAE, contribuiscono ad attenuare la sintomatologia clinica.

5.5.4 Estrogeni e Progesterone in co-somministrazione nell'EAE

Non tutti gli studi condotti sull'EAE hanno confermato l'effetto protettivo del PROG.

Hoffman e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con estradiolo in ratti Lewis affetti da EAE riduce la gravità dei sintomi neurologici ed il grado di infiammazione mentre la somministrazione di PROG determina un peggioramento sintomatologico associato all'aumento di infiltrazione infiammatoria e di neurodegenerazione nel midollo spinale. Tuttavia la co-somministrazione di estradiolo e PROG è in grado di prevenire tutti gli effetti deleteri dovuti al solo trattamento con PROG (Hoffman et al., 2001).

Uno studio condotto su un modello di demielinizzazione indotto da cuprizone in topi C57BL/6 maschi, ha evidenziato che la co-somministrazione di 17 β -estradiolo e PROG previene la demielinizzazione a livello encefalico.

Il co-trattamento determina, infatti, l'aumento di oligodendrociti maturi e di progenitori degli oligodendrociti, contrastando l'effetto down-regolatorio indotto dal cuprizone su entrambe le popolazioni cellulari. Tuttavia la singola somministrazione di PROG o di 17 β -estradiolo non determina alcun effetto sui parametri presi in considerazione (Acs e Kipp, 2009).

Si può dunque affermare che gli steroidi neuroattivi svolgono una funzione anti-infiammatoria, immunomodulante e neuroprotettiva nei confronti di processi degenerativi quali la demielinizzazione e il danno assonale.

Sebbene le basi molecolari di tali funzioni non siano ancora completamente chiare, i risultati ottenuti in studi preclinici giustificano il crescente interesse nei confronti degli steroidi neuroattivi come potenziale strumento terapeutico in patologie neurodegenerative quali la Sclerosi Multipla.

MATERIALI E METODI

1. Stabulazione degli animali

Nella prima parte dello studio, che ha previsto la caratterizzazione del modello, è stato utilizzato un numero totale di 40 ratti Dark Agouti (DA) maschi di 8 settimane (180–200g, Janvier Breeding Center, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Gli animali sono stati randomizzati in due gruppi: animali sani di controllo (CTRL) e animali in cui è stata indotta l'EAE.

Nella seconda parte dello studio, dedicata alla valutazione del ruolo neuroprotettivo del progesterone, sono stati utilizzati 24 ratti DA maschi randomizzati in tre gruppi: animali sani di controllo (CTRL), animali in cui è stata indotta l'EAE e animali affetti da EAE in cui è stato somministrato il progesterone (EAE+PROG).

Gli animali sono stati stabulati presso lo stabulario della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Milano-Bicocca in accordo con le normative comunitarie e italiane vigenti (EU Council Directive 86/609 e DL 116/1992). Gli animali sono stati stabulati in stanze climatizzate e in presenza di un ciclo luce/buio di 12h con libero accesso a cibo e acqua.

2. Induzione dell'EAE in ratti Dark Agouti

L'EAE è stata indotta in ratti DA mediante la somministrazione sottocutanea in entrambe le zampe posteriori di 100mg di omogenato di midollo spinale singenico risospeso in adiuvante incompleto di Freund (IFA; Lorentzen et al., 1995).

I midolli utilizzati per la preparazione dell'omogenato sono stati prelevati da ratti DA sani utilizzati come donatori. Immediatamente dopo il prelievo, i midolli spinali dei DA donatori sono stati congelati in piastre multiwell poste su panetti di ghiaccio secco. Le piastre sono quindi state trasferite e conservate in un congelatore a -80°C. Per l'induzione della malattia i midolli congelati sono stati pesati e riposti in un mortaio refrigerato con azoto liquido per essere disgregati il più finemente possibile con un pestello in ceramica. I midolli frammentati sono stati quindi trasferiti in un tubo

graduato in cui è stata aggiunta soluzione fisiologica (i.e. NaCl 0,9%) in rapporto 300mg midollo:200µl fisiologica. In questa sospensione di midollo è stato aggiunto IFA in quantità tale da ottenere un rapporto finale peso/volume pari a 100mg midollo/400µl. Utilizzando una siringa da 2,5ml e un ago 23G sono stati somministrati 200µl di tale omogenato in ciascuna delle zampe posteriori dei ratti DA ottenendo così una somministrazione complessiva di 100mg midollo/ratto.

Nella prima parte dello studio l'EAE è stata indotta in 20 ratti DA mentre nella seconda parte l'induzione è stata effettuata in 16 animali. I ratti in cui non è stata indotta l'EAE sono stati utilizzati come animali sani di controllo (CTRL).

3. Trattamento con progesterone (PROG)

1mg di PROG (Sigma, Milano, Italia) è stato disciolto in 200µl di olio di sesamo (i.e. veicolo).

Il PROG è stato somministrato sottocute in 8 animali dei 16 a cui è stata indotta l'EAE. Il PROG è stato somministrato a partire dal giorno dell'induzione dell'EAE e con frequenza di giorni alterni fino al giorno 44pi (i.e. dopo l'induzione dell'EAE) per un totale di 21 iniezioni.

I restanti 8 animali affetti da EAE e gli 8 ratti sani di CTRL hanno ricevuto solo il veicolo (i.e. 200µl di olio di sesamo) somministrato sottocute in egual volume e alla medesima frequenza dei ratti trattati con PROG.

4. Valutazioni cliniche

Partendo dal settimo giorno dopo l'induzione di malattia gli animali sono stati valutati per la comparsa di segni neurologici cui è stato attribuito un valore come indicato di seguito: 0=animali sani senza difetto di tonicità della coda; 1=presenza di flaccidità della coda; 2=flaccidità della coda accompagnata da paraparesi lieve o severa degli arti inferiori; 3=paraplegia degli arti inferiori; 4=quadriplegia; 5=morte (Rigolio et al., 2008). Le osservazioni cliniche sono state protrate fino al giorno 45pi.

Nella prima parte dello studio, metà degli animali (i.e. 10 animali di CTRL e 10 animali affetti da EAE) sono stati sacrificati al giorno 14pi (i.e. dopo il primo picco clinico) mentre i restanti animali sono stati sacrificati al giorno 45pi. Nella seconda parte dello studio tutti gli animali sono stati sacrificati al giorno 45pi.

Il giorno 45pi è stato selezionato in quanto, da letteratura, la comparsa di ulteriori ricadute sintomatologiche nei ratti DA risulta inusuale dopo questo time-point (Cavaletti et al., 2004).

Per il sacrificio gli animali sono stati posti in anestesia profonda mediante somministrazione intraperitoneale di Ketamina-Xilazina.

5. Analisi istopatologica

In seguito a sacrificio, sono stati isolati il midollo spinale ed il cervelletto da ciascun animale.

Il rigonfiamento lombare del midollo spinale e il cervelletto sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0,12M, pH 7.4 per 5h a temperatura ambiente (RT).

Una porzione del rigonfiamento lombare non è stata inclusa ed è stata sezionata tramite un Vibratomo (VT 1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). La rimanente parte del rigonfiamento lombare è stata sezionata longitudinalmente in modo da ottenere due emiporzioni una delle quali è stata inclusa in paraffina mediante inclusore automatico ASP300 (Leika) mentre l'altra è stata congelata in OCT.

Sono state quindi realizzate sezioni trasversali e seriali da 5µm per entrambi i tessuti (i.e. midollo spinale e cervelletto) inclusi in paraffina mediante l'impiego di un microtomo LEICA RM2255.

Al fine di individuare la presenza d'infiltrati infiammatori è stata eseguita una colorazione standard con Ematossilina-Eosina (Bio-Optica, Milano, Italia). Le preparazioni istologiche sono state esaminate e fotografate mediante microscopio Nikon E200 (Nikon, San Giovanni Valdarno, AR, Italia).

6. Analisi Immunoistologica

Al fine di individuare la presenza di linfociti T e di macrofagi nell'infiltrato infiammatorio, è stata effettuata una caratterizzazione immunoistologica utilizzando rispettivamente un anticorpo primario di coniglio anti-CD3 (Abcam, Cambridge, UK) ed un anticorpo primario di topo anti-ED1 (CD68; Abcam, Cambridge, UK). Al fine di valutare la presenza di demielinizzazione è stato utilizzato un anticorpo primario di capra anti-MBP (i.e. isoforma da 21.5 KDa; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germania) mentre come marker di danno assonale è stato usato un anticorpo primario di topo in grado di riconoscere la forma non-fosforilata del neurofilamento-H (SMI-32; Covance, Berkeley, CA).

Sezioni seriali da 5µm del midollo spinale incluso in paraffina sono state chiarificate in xylene e reidratate mediante una scala di etanolo a concentrazione decrescente. Per il recupero dell'antigenicità, le sezioni sono state immerse in EDTA 1mM, pH 8.0 e la soluzione è stata portata ad ebollizione (3×5 minuti) mediante l'impiego di un microonde. Per l'immunomarcatura con anticorpo SMI-32, lo smascheramento antigenico è stato effettuato mediante incubazione con Proteinasi-K 20µg/ml in tampone TE a pH 8.0 (Sigma-Aldric, St. Louis, USA) per 5 min a 37°C.

L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita tramite incubazione con H₂O₂ al 3% in PBS per 5 min a RT. Successivamente le sezioni sono state incubate con Normal Goat Serum al 5% (NGS 5% in PBS) per 1h a RT mentre, per l'immunomarcatura con anticorpo anti-MBP, l'incubazione è stata effettuata tramite Albumin Bovin Serum al 5% (BSA 5% in PBS).

Infine le sezioni sono state incubate per tutta la notte (o/n) a 4°C con gli anticorpi primari (anti-CD3, 1:100; anti-ED1, 1:300; anti-MBP 1:50; anti-SMI-32 1:2000; diluiti in NGS 1% in PBS oppure in BSA 1% in PBS).

Il giorno seguente le sezioni sono state incubate per 1h a RT con i seguenti anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (HRP): anti-rabbit (Perkinelmer, Monza, Italia; 1:200 in NGS 1%); anti-mouse (Millipore; Vimodrone, Italia; 1:200 in NGS 1%); anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germania; 1:250 in BSA 1%).

Al fine di rilevare il complesso Antigene-Anticorpo primario-Anticorpo secondario, le sezioni sono state incubate con una soluzione di 3,3'-Diaminobenzidina (DAB tablet 10mg; Sigma-Aldric, St. Louis, USA) alla concentrazione 0,3mg/ml in PBS cui è stata aggiunta H₂O₂ allo 0,001%. Sezioni di milza inclusa in paraffina sono state utilizzate come controllo positivo per CD3 e ED1. Sezioni di midollo spinale incubate solo con i rispettivi anticorpi secondari sono state utilizzate come controllo negativo. Infine le sezioni sono state contro-colorate con Ematossilina, disidratate, montate in DPX (Sigma-Aldric, St. Louis, USA) ed esaminate e fotografate mediante microscopio Nikon E200 (Nikon, San Giovanni Valdarno, AR, Italia).

Al fine di valutare la presenza di cellule immunoreattive per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II), i campioni di midollo spinale lombare non inclusi in paraffina sono stati sezionati trasversalmente mediante Vibratomo (VT 1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in modo da ottenere sezioni di 50 μ m di spessore.

L'immunoistochimica è stata effettuata su floating sections tenute in agitazione moderata. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita mediante incubazione con una soluzione di H₂O₂ al 3% in metanolo 30% per 10min a RT. Successivamente sono stati effettuati dei lavaggi in Washing Buffer (BSA 0.3 %, Triton X-100 0.3 % e NaCl 0.9% in PBS 0,1M). Le sezioni sono state incubate per tutta la notte a 4°C con un anticorpo primario anti-MHC-II (MRC-OX6, Serotec, Bicester, UK) diluito 1:300 in Washing buffer contenente NGS al 3%.

Il giorno seguente le sezioni sono state incubate per 2h a RT con un anticorpo secondario biotinilato (anti-mouse; 31800, Pierce, Rockford, IL; diluito 1:250 in Washing Buffer). Dopo aver effettuato alcuni lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 90 min a RT con il complesso avidina-biotina-perossidasi (ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce, Rockford, IL; diluito 1:250). Il complesso Antigene-Anticorpo è stato rilevato mediante incubazione con una soluzione di 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO) alla concentrazione di 2 g/ml cui è stata aggiunta H₂O₂ allo

0.01% in PBS 0.1M. Infine le sezioni sono state disidratate e montate su vetrini gelatinati.

7. Analisi morfometrica

Il numero di cellule immunoreattive per MHC-II è stato valutato nella regione della sostanza bianca localizzata tra le corna dorsali del midollo spinale lombare.

Il numero di cellule MHC-II⁺ è stato stimato mediante il metodo di dissezione ottica (Tapia-Gonzalez et al., 2008) utilizzando lo spessore totale della sezione come altezza di riferimento per l'analisi (Hatton e von Bartheld, 1999) e un piano per il conteggio di 50×50 μ m. Lo spessore delle sezioni è stato calcolato utilizzando un misuratore digitale (digital length gauge device; Heidenhain-Metro MT 12/ND221; Traunreut, Germania) connesso al tavolino porta-vetrino di un microscopio Leitz. Per ogni campione è stato utilizzato un numero totale di 9 piani di conteggio. Il numero di nuclei delle cellule MHC-II⁺ entrati nel piano focale è stato contato analizzando tutto lo spessore del campione.

Il processamento dei campioni di midollo spinale al Vibratomo, l'analisi immunoistologica per MHC-II e l'analisi morfometrica sono state effettuate dal gruppo di ricerca del Prof. Garcia-Segura Luis Miguel. Istituto Cajal, Madrid, Spagna.

8. Analisi citofluorimetrica

Per le analisi di citometria a flusso ciascun midollo è stato sezionato longitudinalmente ed emiporzioni del tratto cervicale, toracico, lombare e caudale sono state immerse in NaCl 0,9%. Le analisi sono state effettuate in accordo al protocollo modificato di McCombe e collaboratori (Rigolio et al., 2008). In breve, i campioni di midollo spinale sono stati omogenati, risospesi in una soluzione di Percoll/HBSS e centrifugati. Dopo aver rimosso i residui di mielina, i leucociti infiltranti sono stati isolati su un gradiente di Ficoll. I leucociti così ottenuti sono stati successivamente marcati con anticorpi anti-

CD3-FITC, CD4-biotinilato e CD8-PE (BD, San Jose, CA). E' stata in seguito eseguita una seconda incubazione con Streptavidina-PerCP in grado di riconoscere il CD4-biotinilato.

Mediante FACSCanto sono stati acquisiti 20000 eventi nella regione dei linfomonociti individuando, all'interno della popolazione positiva per CD3, le sottopopolazioni positive rispettivamente per CD4 e CD8. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Diva (BD, San Jose, CA).

9. RNase protection assay (RPA)

Sonde di RNA marcate radioattivamente e complementari all'mRNA di interesse (cRNA) sono state preparate effettuando una trascrizione *in vitro* in presenza di nucleotidi marcati: [³²P]CTP (Perkin Elmer, Monza, Italia). I plasmidi utilizzati per creare le sonde di cRNA (pCR[®]II-TOPO[®]; Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italia) contengono i seguenti inserti: 390pb per MBP (i.e. mRNA di interesse) e 110pb per 18s. Tutte le sonde di cRNA sono state ottenute con un'attività specifica >10⁸ cpm/μg.

Un'aliquota di 3μg di RNA precedentemente estratto da ciascun campione di midollo lombare è stata utilizzata per l'RNasi Protection Assay (RPA) come descritto in precedenza (Leonelli et al., 2007; Roglio et al., 2008).

In breve, dopo aver effettuato una precipitazione in etanolo, i campioni di RNA sono stati risospesi in 20μl di soluzione di ibridazione (formamide 80%, PIPES 40mM a pH 6.4; sodio acetato 400mM a pH 6.4, EDTA 1mM) contenente 600000 cpm specifici per la sonda di cRNA-³²P per MBP e 100000 cpm specifici per la sonda di cRNA-³²P per 18s. I campioni sono stati denaturati a 85°C per 10 minuti e lasciati per una notte a 45°C, in modo da permettere l'ibridazione delle sonde con i rispettivi mRNA endogeni.

Terminata l'ibridazione, ai campioni sono stati aggiunti 200μl di un tampone di digestione (NaCl 300mM, Tris-HCl 10mM, pH 7.4, EDTA 5mM pH 7.4) contenente una miscela di RNasi diluita 1:400 rispetto alla soluzione stock (1mg/ml RNase A e 20 U/μl RNase T1) ed è stata effettuata un'incubazione per 30 minuti a 30°C. Al fine di bloccare il processo di digestione, è stata aggiunta una soluzione 1:2 di proteinasi K e di SDS al 10% ed i campioni sono stati lasciati in incubazione a 37°C per 15 min.

Successivamente gli ibridi ^{32}P -cRNA-mRNA sono stati estratti dalla miscela di digestione con fenolo basico e cloroformio (24:1). I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 13000 rpm, il sottonatante è stato eliminato ed è stata conservata la fase acquosa contenente gli ibridi di interesse. Gli ibridi così purificati sono stati fatti precipitare con etanolo 100% freddo.

I pellet, ottenuti dopo 20 minuti di centrifugazione a 13000 rpm, sono stati fatti essiccare in speed vacuum e risospesi in un buffer di caricamento (formamide 80%, cianolo xilene 0.1%, blu di bromo fenolo 0.1%, EDTA 2mM a pH 8), riscaldati a 95 °C per 5 minuti e separati su un gel di poliacrilamide al 5% in condizioni denaturanti (Urea 7M).

Una volta terminata la separazione elettroforetica, il gel è stato trasferito su carta e poi essiccato in gel dryer per circa 1 ora e 15 minuti. Il gel essiccato è stato esposto a pellicola fotografica (Kodak Scientific Imaging film Ready-pack, Sigma).

I frammenti protetti sono stati visualizzati tramite autoradiografia.

I livelli di mRNA di MBP e della subunità ribosomiale 18s sono stati calcolati misurando l'area del picco densitometrico acquisita tramite uno scanner (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) ed analizzata dal programma NHI Image J 1.60. Al fine di assicurarsi che l'intensità delle bande rientrasse in un intervallo di linearità, le bande analizzate sono state scelte su lastre con differenti tempi d'esposizione. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai valori relativi allo standard interno (rRNA codificante per la subunità ribosomiale 18s) ed è stata poi calcolata la media per ciascun gruppo sperimentale. I valori dei controlli ottenuti in diversi esperimenti erano tutti nel range del 10%.

Le analisi di RPA sono state effettuate dal gruppo di ricerca del Prof. Melcangi Roberto Cosimo. Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Italia.

10. Real-time PCR

In primo luogo l'RNA totale è stato estratto da campioni di midollo spinale lombare congelati in azoto liquido al momento del prelievo. Per l'estrazione è

stato utilizzato il protocollo standard di estrazione con Trizol basato sul metodo sviluppato da Chomczynski e Sacchi (1987). Successivamente l'RNA è stato estratto secondo le indicazioni del fornitore (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italia).

L'RNA così ottenuto da ciascun campione è stato sciolto in acqua priva di RNasi, quantificato e sono state preparate delle aliquote per le successive analisi. Al fine di evitare contaminazioni da DNA, un'aliquota di 5 μ g prelevata da ogni campione, è stata trattata con DNasi (AMPD1 DNase I—Amplification Grade, Sigma, St. Louis, MO) e nuovamente quantificata.

I campioni di RNA sono stati analizzati mediante Real-time PCR quantitativa (qRT-PCR; CFX384 Real-time system, Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italia) utilizzando sonde TaqMan. Al fine di ottenere la retro-trascrizione dell'RNA a cDNA durante il primo ciclo di qRT-PCR, è stato utilizzato il kit iScript™ onestep RT-PCR (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italia).

Sono state utilizzate sonde TaqMan MGB (Life Technologies; Monza, Italia) specifiche per amplificare cDNA codificanti per gli enzimi steroidogenici 5 α -R (Rn00567064_m1) e 3 α -HSD (Akr1c14, Rn00593618_m1), per le citochine pro-infiammatorie IL-1 β (Rn00580432_m1) e TNF- α (Rn99999017_m1), per la citochina anti-infiammatoria TGF β -1 (Rn00572010_m1).

L'analisi è stata condotta in un termociclatore da 384 pozzetti, in triplicato come reazione in duplex (i.e. i primers e le probes del gene target e dello standard interno -18s rRNA- sono stati aggiunti alla stessa miscela di reazione).

Al fine di calcolare l'espressione relativa del gene target, è stato utilizzato il metodo comparativo del ciclo soglia (Ct). In base alle indicazioni del fornitore, è stato condotto un esperimento di validazione al fine di dimostrare che l'efficienza di amplificazione del gene target e dell'rRNA 18s fosse approssimativamente uguale e vicina al 100%.

Il Ct, che viene definito come il ciclo in cui il segnale di fluorescenza è superiore al rumore di fondo, è stato determinato in tutte le reazioni di PCR. Le analisi sono state eseguite sottraendo al valore del Ct relativo al cDNA target il valore del Ct relativo al 18s rRNA in modo da ottenere il Δ Ct. In seguito è stata calcolata la media dei Δ Ct dei campioni appartenenti a

ciascun gruppo sperimentale e, a questi valori, è stata sottratta la media dei ΔCt dei campioni appartenenti al gruppo di controllo. Tale equazione porta i campioni di controllo ad un valore di riferimento pari a 0 e consente di ottenere il $\Delta\Delta\text{Ct}$ dei campioni sperimentali. Questi valori sono stati poi utilizzati per generare l'incremento di espressione genica relativa al controllo utilizzando l'equazione: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ che porta i valori di espressione genica del controllo a 1. Tale conversione matematica rappresenta in modo accurato l'amplificazione logaritmica che si ottiene ad ogni ciclo di PCR. Tuttavia, l'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i valori di $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Nella seconda parte dello studio è stata eseguita l'analisi dell'espressione genica delle citochine IL-1 β , TNF- α e TGF β -1.

Le analisi sono state effettuate in un termociclatore da 384 pozzetti, in triplicato come reazioni in duplex, fatta eccezione per il TNF- α che è stato amplificato in simplex.

In questo secondo studio, la quantificazione del messaggero è stata eseguita tramite interpolazione con una curva standard costruita utilizzando RNA a concentrazione nota che è stato amplificato insieme ai campioni target (i.e. nella stessa analisi Real-time PCR).

Attraverso l'interpolazione del valore del Ct con i valori della curva è stato possibile ottenere un valore relativo alla quantità di RNA.

11. Western blotting

La porzione lombare del midollo spinale è stata omogenata a freddo mediante l'utilizzo di un Ultra-Turrax (IKA Works, Wilmington, NC, USA) in un buffer di lisi (Nonidet P-40 1% in PBS, pH 7.4) cui sono stati aggiunti inibitori delle proteasi (Roche Diagnostic spa, Monza, Italia).

Al fine di ottenere l'estratto proteico, l'omogenato è stato centrifugato per 3 minuti a 400g per rimuovere i detriti, e il surnatante così ottenuto ("crudo") è stato quantificato e utilizzato come tale per la determinazione dell'espressione proteica di MBP. Per l'analisi dell'espressione proteica delle subunità α della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica, il "crudo" è stato centrifugato per

un'ora a 100000g ed i pellets, contenenti le membrane cellulari, sono stati risospesi nel buffer di lisi privo di Nonidet P-40.

La concentrazione proteica di ciascun campione è stata determinata mediante il metodo di Bradford, usando BSA come standard (Bradford, 1976).

Per l'analisi dell'espressione proteica delle subunità α , la stessa quantità di ciascun campione è stata solubilizzata in un buffer contenente SDS 0,1% e lasciata in incubazione per 45 minuti a 37°C. I campioni sono stati separati su un gel di SDS-poliacrilamide all'8% e trasferiti o/n tramite elettroblotting su filtro di nitrocellulosa (Trans-blot; Bio-Rad, Milano, Italia). Nel caso di MBP, ciascun campione è stato solubilizzato in SDS 0,1%, lasciato per 5 minuti a 100°C e l'estratto proteico è stato separato su un gel di SDS-poliacrilamide al 20%.

Le membrane sono state sottoposte a blocking (Tween 20 0,1% e latte in polvere 5% in PBS) mantenuto a RT. I filtri sono stati tagliati e la parte superiore è stata incubata o/n a 4°C con i seguenti anticorpi primari: anticorpo di topo anti- α_3 (ABR, Indianapolis, IN, USA); anticorpo di coniglio anti- α_2 (Upstate, Milano, Italia); antisiero di coniglio anti- α_1 (Upstate); anticorpo di ratto anti-MBP (Millipore, Billerica, MA, USA). Gli anticorpi primari sono stati diluiti 1:1000 in PBS contenente Tween 20 allo 0,1% e latte in polvere al 3%. In seguito i filtri sono stati lavati per 30 minuti ed incubati con anticorpi secondari coniugati con HRP (anti-rabbit per α_1 e α_2 ; anti-mouse per α_3 ; Sigma-Aldrich, Milano, Italia; 1:2000; anti-rat per MBP; Millipore, Vimodrone, Italia; 1:10000).

Parallelamente, la parte rimanente dei filtri, è stata incubata con un anticorpo primario anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia; 1:10000) utilizzata come controllo interno. Dopo un lavaggio, si è proceduto con un'incubazione con anticorpo secondario-HRP anti-mouse (Amersham, Milano, Italia; 1:10000).

Il complesso proteina-anticorpo è stato rilevato mediante ECL (Amersham, Milano, Italia).

L'espressione proteica delle subunità α , di MBP e della β -actina è stata calcolata misurando l'area del picco densitometrico delle bande acquisite

mediante uno scanner (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) e analizzate con il programma di analisi densitometrica Image J 1.60 (NIMH, Bethesda, MD, USA). Al fine di assicurarsi che l'intensità delle bande rientrasse in un intervallo di linearità, le bande analizzate sono state scelte su lastre con differenti tempi d'esposizione.

Il valor medio del gruppo di riferimento (i.e. EAE+V) all'interno di un singolo esperimento, è stato posto a 100 e tutti gli altri valori sono stati espressi come percentuale. I valori dei controlli ottenuti in diversi esperimenti erano tutti nel range del 10%.

12. Attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica

La pompa Na⁺,K⁺-ATPasica è coinvolta nel mantenimento del gradiente elettrochimico adeguato alla propagazione dell'impulso elettrico, quindi la sua attività è indice della corretta funzionalità neuronale.

Il dosaggio dell'attività è stato effettuato attraverso un metodo spettrofotometrico (Bianchi et al., 2004).

Al momento del prelievo una piccola porzione del midollo spinale lombare di ciascun campione è stata congelata in ghiaccio secco e conservata a -80°C fino al momento dell'omogenizzazione. I campioni sono stati omogenati in una soluzione fredda contenente saccarosio 0,25M, EGTA 1,25mM e Tris 10mM a pH 7.5, utilizzando un omogenatore Elvehjem-Potter di vetro (DISA, Milano, Italia). Durante l'omogenizzazione i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio per evitarne la degradazione e successivamente sono stati trasferiti in eppendorf e conservati a - 80°C fino al momento delle analisi.

La misurazione dell'attività enzimatica della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica è stata effettuata attraverso un metodo indiretto che prevede la determinazione di tale attività come risultato della differenza tra l'attività ATPasica totale e quella della Mg⁺⁺-ATPasi. Quest'ultima è stata determinata inibendo, in maniera specifica, l'attività della Na⁺,K⁺-ATPasi tramite ouabaina.

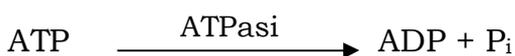
La determinazione dell'attività enzimatica è stata eseguita secondo il metodo di Scharschmidt (Scharschmidt et al., 1979) che prevede l'uso di ouabaina, adenosina trifosfato (ATP; vanadato <10 ppm), fosfoenolpiruvato (PEP),

nicotinammide adenina dinucleotide ridotta (NADH), piruvato chinasi (PK) e lattato deidrogenasi (LDH).

Per eseguire tale analisi è stato utilizzato un buffer di reazione costituito da: Tris 130,9mM a pH 7.4 a 37°C, EGTA 10,5mM, NaCl 125,6mM, KCl 13,09mM e NaN₃ 5,24mM. Il giorno dell'analisi sono stati aggiunti al buffer di reazione NADH e PEP, in quantità tale da ottenere una concentrazione finale rispettivamente di 0,52mM e 2,62mM. Una parte di questa soluzione è stata utilizzata tal quale, mentre a una parte è stata aggiunta ouabaina in concentrazione pari a 1,06mM. E' stata anche preparata una soluzione di MgCl₂ 200mM per sciogliere l'ATP.

Per le analisi sono state utilizzate delle cuvette di quarzo contenenti il buffer con ouabaina o privo di ouabaina; in seguito nelle cuvette sono stati aggiunti 20µl del complesso enzimatico PK-LDH e 10µl del campione omogenato scongelato in precedenza. Le cuvette sono state incubate per 3 minuti a 37°C all'interno dello spettrofotometro e successivamente, al fine di avviare la reazione, sono stati aggiunti 25µl di ATP. Infine si è proceduto all'agitazione mediante rapida inversione e si è dato inizio alla lettura.

Le reazioni che avvengono sono le seguenti:



Somma delle reazioni:



La reazione di ossidazione del NADH viene monitorata in modo continuo per 12 minuti e misurata spettrofotometricamente a 340nm.

L'attività della Mg⁺⁺-ATPasi, misurata in presenza di ouabaina (3mM finale), è stata espressa come attività specifica (µmoli Pi/h*mg proteina).

L'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica è stata calcolata sottraendo all'attività rilevata in assenza di ouabaina (i.e. attività ATPasica totale) quella misurata in presenza di ouabaina (i.e. attività della Mg^{++} -ATPasi).

Tutti i valori sono stati espressi come media calcolata tra almeno due determinazioni. La quantità proteica di ciascun campione è stata determinata mediante il metodo di Bradford, usando BSA come standard (Bradford, 1976).

13. Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS-MS)

L'analisi dei livelli degli steroidi neuroattivi è stata condotta tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (analisi LC-MS/MS).

Il tratto toracico del midollo spinale (60-80 mg di tessuto) è stato estratto e purificato seguendo la procedura indicata da Caruso e collaboratori (Caruso et al., 2008a) per l'analisi quantitativa degli steroidi neuroattivi.

Brevemente, dopo aver aggiunto gli standard interni deuterati, i campioni sono stati omogenati in 2ml di MeOH/acido acetico (99:1 v/v) utilizzando un Tissue Lyser (Qiagen, Milano, Italia).

Dopo una notte d'incubazione a 4°C, i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 5 minuti per separare il solvente organico dal pellet solido. Quest'ultimo è stato in seguito risospeso e ricentrifugato per 2 volte con 1ml di MeOH/acido acetico (99:1 v/v). La fase organica ottenuta dalle 3 centrifugazioni è stata poi riunita in un'unica provetta e asciugata con un leggero flusso di azoto in un bagnetto a 40°C. I campioni sono stati risospesi in 3ml di MeOH/H₂O (10:90 v/v) e sono stati fatti passare attraverso una cartuccia SPE (Discovery DS-C18 500mg; Supelco, Milano, Italia) precedentemente attivata con 5ml di MeOH e 5ml di MeOH:H₂O 1:9 v/v.

Gli steroidi sono stati eluiti in MeOH, concentrati e trasferiti in vials prima dell'analisi con cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa.

Gli esperimenti in modalità ionica positiva a pressione atmosferica (APCI+) sono stati eseguiti usando uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare (LTQ, ThermoFisher Co, San Jose, CA, USA). Lo strumento è stato

equipaggiato con una pompa per cromatografia liquida Surveyor Plus e con un autocampionatore Plus (ThermoFisher Co, San Jose, CA, USA).

In cromatografia liquida sono state utilizzate come fasi mobili H₂O/acido formico 0,1% (A) e MeOH/acido formico 0,1% (B) ed è stato usato il seguente gradiente (velocità di flusso 0.5 ml/min): T_{0,0} 70% A, T_{1,5} 70% A, T_{2,0} 55% A, T_{3,0} 55% A, T_{35,0} 36% A, T_{40,0} 25% A, T_{41,0} 1% A, T_{45,0} 1% A, T_{45,2} 70% A, T_{55,0} 70% A.

La valvola split è stata settata in posizione di scarico tra 0-6.99 minuti, indirizzata alla sorgente tra 6.99-43.93 minuti e di nuovo allo scarico tra 43.93-55 minuti. La colonna Hypersil Gold (100x3mm, 3µm; ThermoFisher Co, San Jose, CA, USA) è stata mantenuta a 40°C. È stato usato un volume d'iniezione di 25µl e l'ago di iniezione è stato lavato con MeOH/H₂O 1/1 (v/v).

L'analisi quantitativa è stata effettuata sulla base di curve di calibrazione preparate ed analizzate usando standard di riferimento interni deuterati, secondo la stessa procedura descritta per i campioni. Gli standard deuterati utilizzati sono i seguenti: D₄-PREG (sintetizzato dal Dott. P. Ferraboschi); D₉-PROG (Medical Isotopes; Pelham, NH, USA); D₄-17β-E (CDN Isotope Pointe-Claire; Quebec-Canada). La linearità delle curve standard (r²) è stata valutata utilizzando GraphPad4 PRISM (versione 4, GraphPad Software, la Jolla, CA).

14. Analisi statistica

I dati quantitativi ottenuti negli esperimenti sono stati analizzati mediante analisi statistica in accordo con i protocolli sperimentali e con la natura dei dati (i.e. Student's t-test o Anova seguito dal post test Tukey's o Dunnet's).

Un valore di P<0.05 è stato considerato significativo.

Tutte le analisi sono state condotte utilizzando GraphPad PRISM, versione 4.

RISULTATI

1. CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO DI EAE IN RATTI DARK AGOUTI

1.1 Decorso clinico

L'EAE è stata indotta in 20 ratti Dark Agouti (DA) maschi mediante la somministrazione sottocutanea nelle zampe posteriori di 100mg di omogenato di midollo spinale singenico risospeso in adiuvante incompleto di Freund (IFA) (Lorentzen et al., 1995). Ratti DA non immunizzati (n=20) sono stati utilizzati come animali sani di controllo (CTRL).

E' noto che nel ratto DA la patologia ha un decorso cronico caratterizzato dal raggiungimento di un picco clinico (i.e. massimo di gravità clinica) a cui seguono fasi di remissione e riacutizzazione di malattia (Lorentzen et al., 1995).

Al fine di monitorare l'andamento clinico dell'EAE nel nostro modello è stata eseguita una valutazione dei sintomi neurologici a partire dal giorno 9 dall'induzione di malattia (giorno 9pi: post induction) e fino al giorno 45pi secondo una scala semi-quantitativa che attribuisce valori crescenti a gradi crescenti di disabilità motoria (score clinico).

Come mostrato in Figura 1.1, il valore dello score clinico aumenta progressivamente a partire dal giorno 9pi e raggiunge il suo massimo al giorno 12pi. Le fasi di riacutizzazione di malattia si osservano tra il giorno 22-24pi, al giorno 31pi, tra il giorno 38-39pi e al giorno 43pi (Fig.1.1).

Sulla base del decorso clinico dei ratti DA affetti da EAE, abbiamo deciso di effettuare tutte le analisi istologiche e molecolari sia in prossimità del picco clinico che in una fase avanzata della patologia, ossia quando gli animali avessero sperimentato più di una recidiva. Per tale motivo abbiamo deciso di sacrificare metà degli animali di controllo e metà degli animali affetti da EAE al giorno 14pi, selezionando i ratti con score clinico più alto, mentre i rimanenti animali sono stati sacrificati al giorno 45pi.

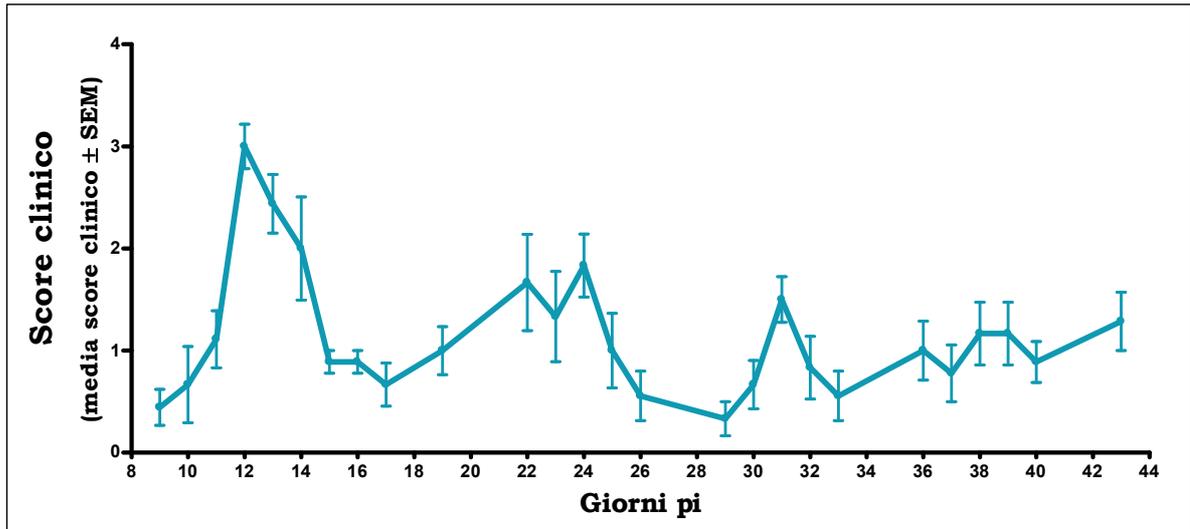


Fig.1.1 Score clinico dei ratti DA affetti da EAE. A partire dal giorno 9pi gli animali sono stati valutati per la comparsa di segni neurologici cui è stato attribuito un valore come indicato di seguito: 0=animali sani; 1=presenza di flaccidità della coda; 2=flaccidità della coda accompagnata da paraparesi lieve o severa degli arti inferiori; 3=paraplegia degli arti inferiori; 4=tetraplegia; 5=morte. I dati sono espressi come media \pm SEM (n=20 fino al giorno 14pi; n=10 fino al termine dello studio). Giorni pi: Giorni dopo l'immunizzazione.

1.2 Profilo neuroimmunologico

La neuroinfiammazione è una reazione infiammatoria locale del sistema nervoso centrale (SNC) che rappresenta la risposta ad uno stimolo dannoso e che ha il fine ultimo di eliminare o neutralizzare tale stimolo in modo da ristabilire l'integrità tissutale. La fine regolazione di questo processo facilita la guarigione ma, quando il processo neuroinfiammatorio risulta incontrollato, esso contribuisce all'instaurarsi di una condizione patologica (Giatti et al., 2012).

Lo stato neuroinfiammatorio cronico è un tratto caratteristico dell'EAE.

La risposta neuroinfiammatoria nell'EAE può essere sostenuta sia da leucociti infiltranti il SNC, come i linfociti ed i macrofagi, che da cellule residenti come la microglia.

In condizioni fisiologiche la microglia si trova in uno "stato di riposo" caratterizzato dalla bassa espressione di recettori di membrana che ne regolano le funzioni immunologiche (Hanisch e Kettenmann, 2007).

Quando stimolata, la microglia up-regola molecole di superficie tra cui il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) (Rock et al., 2004).

Inoltre la microglia attivata è in grado di produrre mediatori solubili che possono determinare sia effetti dannosi (i.e. citochine pro-infiammatorie, specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto) che effetti benefici (i.e. citochine anti-infiammatorie e fattori trofici) (Giatti et al., 2012).

Il rilascio di questi mediatori da parte delle cellule gliali determina un ulteriore reclutamento di monociti/macrofagi e di linfociti circolanti che contribuisce a sostenere una risposta neuroinfiammatoria prolungata (Schwartz et al., 2006).

1.2.1 Analisi istologica dell'infiltrato infiammatorio

Al fine di valutare il grado d'infiammazione a livello del midollo spinale, al momento del sacrificio (i.e. Giorno 14pi e 45pi) è stata prelevata una porzione del rigonfiamento lombare del midollo spinale da animali DA affetti da EAE e da animali sani di controllo. Abbiamo deciso di eseguire le analisi istologiche a livello della porzione lombare del midollo spinale in quanto è noto che, in questo modello di EAE, tale regione del SNC è quella maggiormente compromessa dalla malattia.

Il tessuto è stato incluso in paraffina, sono state eseguite delle sezioni seriali di 5µm e sono state effettuate colorazioni istologiche con Ematossilina-Eosina al fine di identificare la presenza di infiltrati infiammatori.

Come mostrato in Fig.1.2, negli animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14pi si evidenzia la presenza di infiltrati leucocitari organizzati in regione perivascolare (Fig.1.2 B-D). Tali infiltrati risultano localizzati nella sostanza bianca (Fig.1.2 C) o nella sostanza grigia del midollo spinale (Fig.1.2 B, D).

Nel midollo lombare degli animali affetti da EAE e sacrificati al giorno 45pi, invece, la quasi totalità dei campioni analizzati (n=9/10) non presenta evidenti infiltrati infiammatori (Fig.1.2 F, H). Nello specifico in un solo caso abbiamo osservato la permanenza d'infiltrati leucocitari localizzati sia nella regione sub-meningea che a livello perivascolare nella sostanza bianca del midollo (Fig.1.2 G).

Come da atteso, nei tessuti prelevati dagli animali sani di controllo, la colorazione istologica non ha mostrato la presenza di infiltrati infiammatori a nessuno dei tempi sperimentali presi in esame (Fig.1.2 A, E).

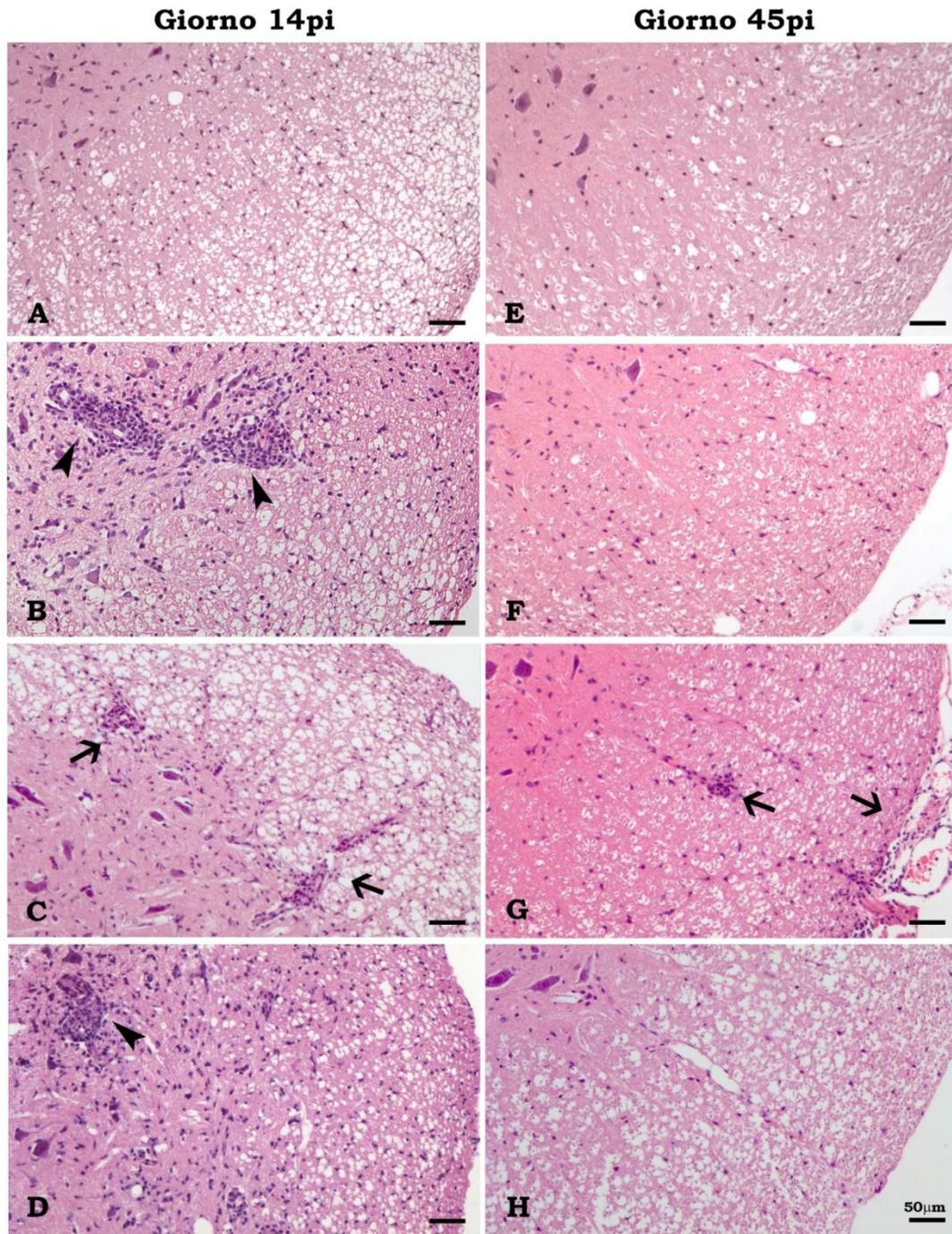


Fig.1.2 Analisi istopatologica del midollo spinale. La porzione lombare del midollo spinale è stata isolata da animali sani di controllo (A, E) e affetti da EAE (B-D; F-H) al giorno 14 dall'immunizzazione (Giorno 14pi; B, C, D) e al giorno 45 dall'immunizzazione (Giorno 45pi; F, G, H). La colorazione con Ematossilina-Eosina mostra la presenza di infiltrati leucocitari particolarmente evidenti negli animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14pi (B-D). Freccia: infiltrato infiammatorio localizzato nella sostanza bianca del midollo spinale. Punta di freccia: infiltrato infiammatorio localizzato nella sostanza grigia del midollo spinale. Barra:50µm.

1.2.2 Quadro immunohistologico dell'infiltrato infiammatorio

Al fine di caratterizzare fenotipicamente le cellule che compongono l'infiltrato infiammatorio, abbiamo utilizzato delle tecniche di immunohistochimica per identificare i linfociti T (CD3⁺) e le cellule con attività macrofagica (ED1⁺) nel midollo lombare.

In tutti i campioni di animali affetti da EAE prelevati al giorno 14pi (n=10), la marcatura per CD3 ci ha consentito di evidenziare la presenza di linfociti T localizzati a livello degli infiltrati infiammatori precedentemente identificati tramite colorazione con Ematossilina-Eosina (Fig.1.3 B-D).

Nel midollo lombare di animali affetti da EAE sacrificati al giorno 45pi, invece, cellule immunoreattive a CD3 si osservano sporadicamente (Fig.1.3 F-H).

Come da atteso, nei tessuti prelevati dagli animali sani di controllo, l'immunomarcatura non ha consentito di evidenziare la presenza di cellule CD3⁺ a nessuno dei tempi sperimentali presi in esame (Fig.1.3 A, E).

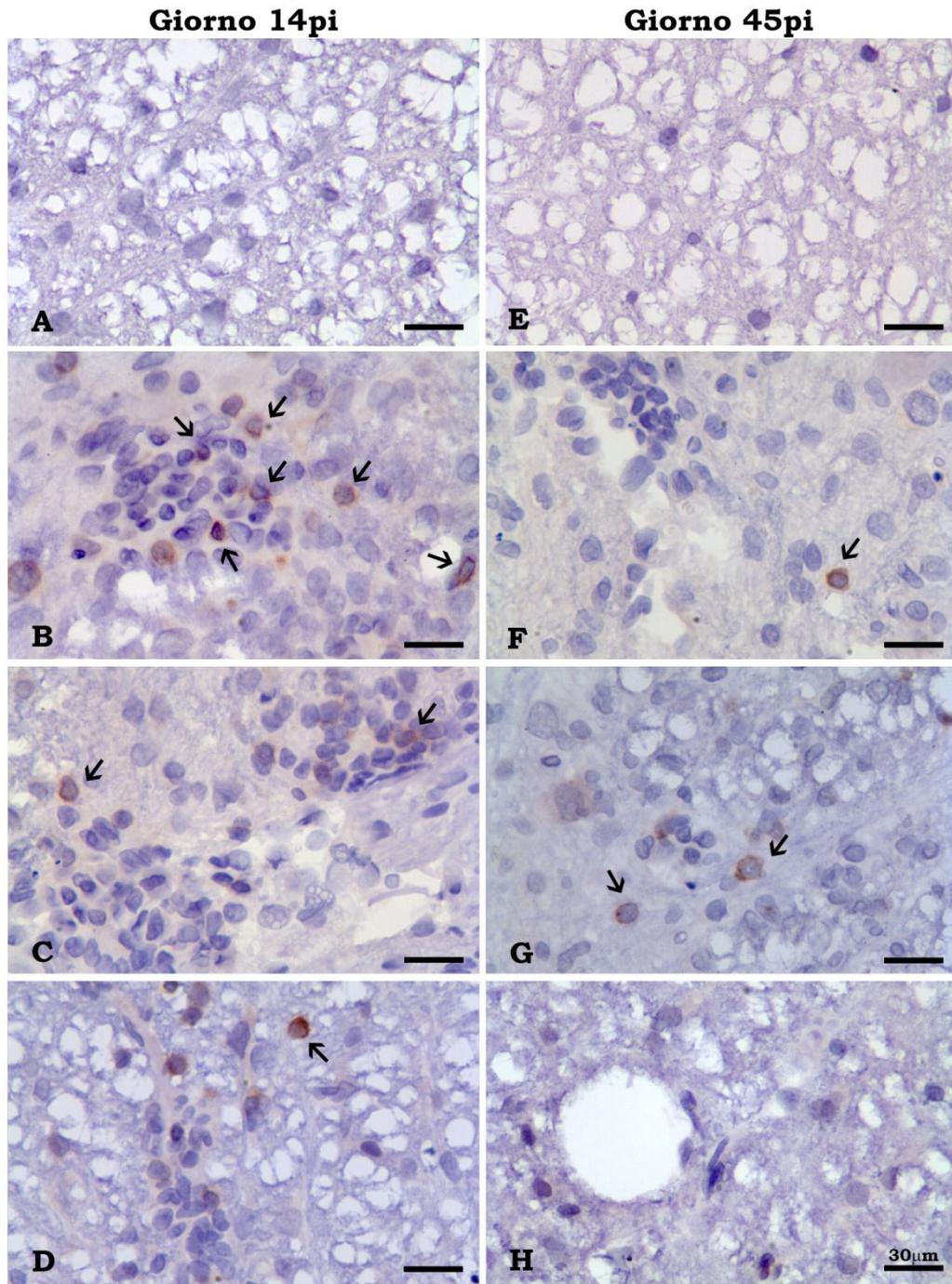


Fig.1.3 Analisi immunoistologica su midollo spinale lombare. La marcatura effettuata con un anticorpo anti-CD3 mostra la presenza di linfociti T CD3⁺ (cellule marcate in marrone) a livello degli infiltrati infiammatori negli animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14 dall'immunizzazione (Giorno 14pi; B, C, D) e al giorno 45 dall'immunizzazione (Giorno 45pi; F, G, H). L'immunomarcatura mostra l'assenza di linfociti T CD3⁺ nel midollo spinale isolato da animali sani di controllo (A, E). Barra:30µm.

Effettuando un'analisi immunoistologica per ED1 è stato messo in evidenza che la maggior parte delle cellule costituenti l'infiltrato infiammatorio risulta essere di natura macrofagica.

Al giorno 14pi negli animali affetti da EAE, gli infiltrati infiammatori localizzati sia nella sostanza bianca che nella sostanza grigia del midollo spinale presentano un'elevata immunoreattività per ED1 (Fig.1.4; B-D).

Nonostante la colorazione istologica con Ematossilina-Eosina non avesse indicato la presenza di evidenti infiltrati leucocitari (Vd. Fig.1.1), nei tessuti prelevati al giorno 45pi si osservano cellule macrofagiche ED1⁺.

A differenza di quanto osservato al giorno 14pi negli animali affetti da EAE, a 45 giorni le cellule ED1⁺ risultano confinate per lo più in regione sub-meningea e solo sporadicamente si localizzano nella sostanza bianca del midollo (Fig.1.4 F, G, H).

Nei tessuti prelevati dagli animali sani di controllo non sono state identificate cellule ED1⁺ a nessuno dei due tempi sperimentali presi in esame (Fig.1.4 A, E).

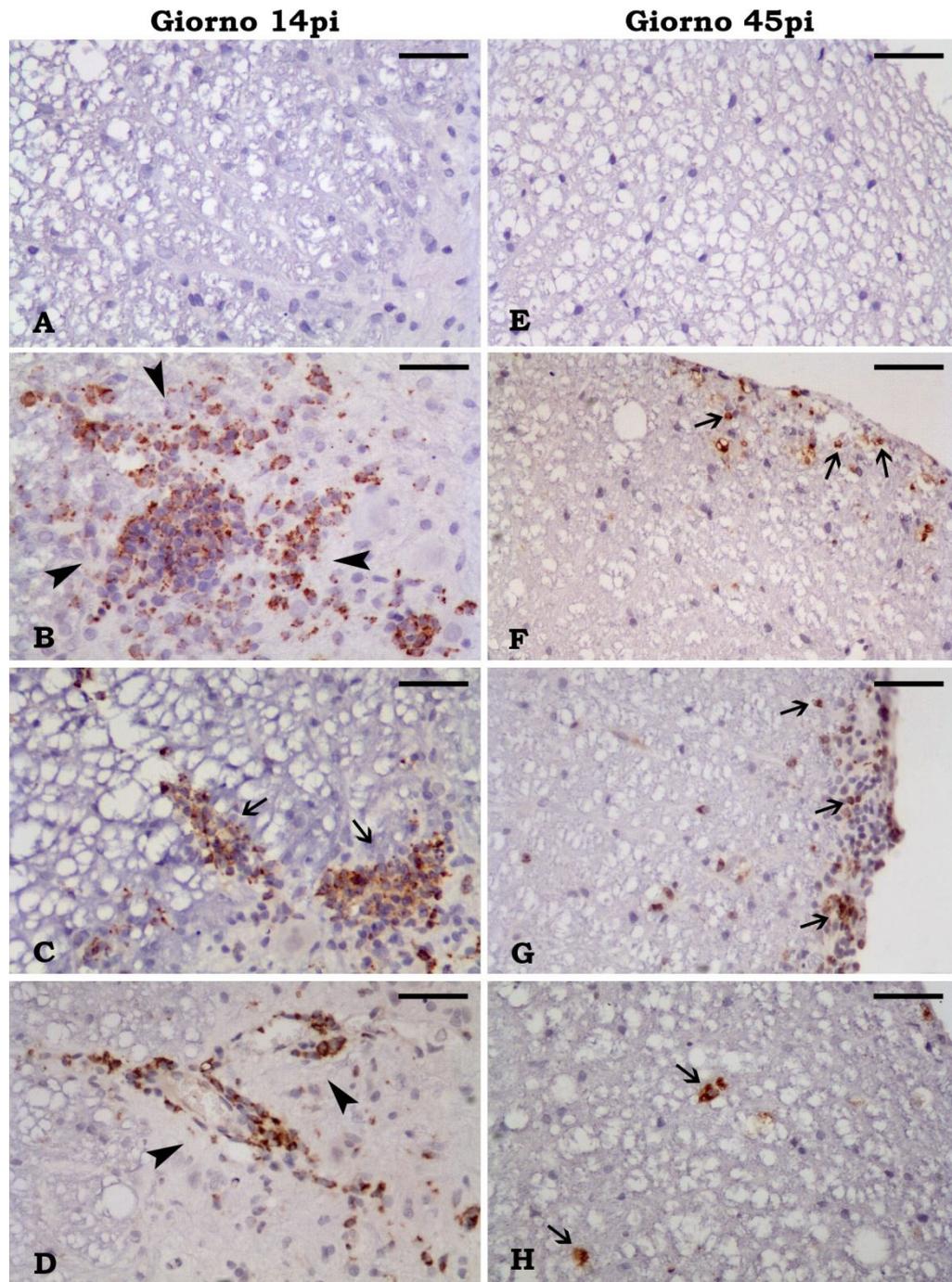


Fig.1.4 Analisi immunoistologica su midollo spinale lombare. La marcatura effettuata con un anticorpo anti-ED1 mostra la presenza di cellule macrofagiche ED1⁺ (colorazione marrone) a livello degli infiltrati infiammatori negli animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14 dall'immunizzazione (Giorno 14pi; B, C, D) e al giorno 45 dall'immunizzazione (Giorno 45pi; F, G, H). L'immunomarcatura mostra l'assenza di macrofagi ED1⁺ nel midollo spinale isolato da animali sani di controllo (A, E). Freccia: infiltrato infiammatorio localizzato nella sostanza bianca del midollo spinale. Punta di freccia: infiltrato infiammatorio localizzato nella sostanza grigia del midollo spinale. Barra:50µm.

Il cervelletto è preposto al coordinamento del movimento. Inoltre nella SM i casi di coinvolgimento cerebellare sono meno frequenti ma associati ad una prognosi peggiore (Ferrarese et al., 2011. McGraw Hill). Per tale motivo abbiamo prelevato anche dei campioni di cervelletto al giorno 14pi e al giorno 45pi sia da animali sani che da animali affetti da EAE.

Mediante la colorazione istologica con Ematossilina-Eosina è stato evidenziato che al giorno 14pi solo 2 dei campioni analizzati (n=8) mostrano la presenza di infiltrato infiammatorio (Fig.1.5; A, D).

La Fig.1.5 (A, B, C) mostra la presenza di infiltrati infiammatori perivascolari che interessano lo strato granulare del cervelletto. La maggior parte delle cellule infiammatorie è risultata immunoreattive a ED1 (B, C).

I pannelli D, E e F mostrano un esteso infiltrato leucocitario con presenza di macrofagi ED1⁺ che, oltre ad essere concentrati perivascolarmente, tendono a diffondere nella sostanza bianca cerebellare.

Al giorno 45pi, nessun cervelletto isolato da animali affetti da EAE (n=9) ha mostrato la presenza di alcun focus infiammatorio.

Dato il numero esiguo di animali che hanno presentato infiammazione a livello cerebellare, le successive analisi molecolari sono state eseguite soltanto sui campioni di midollo spinale.

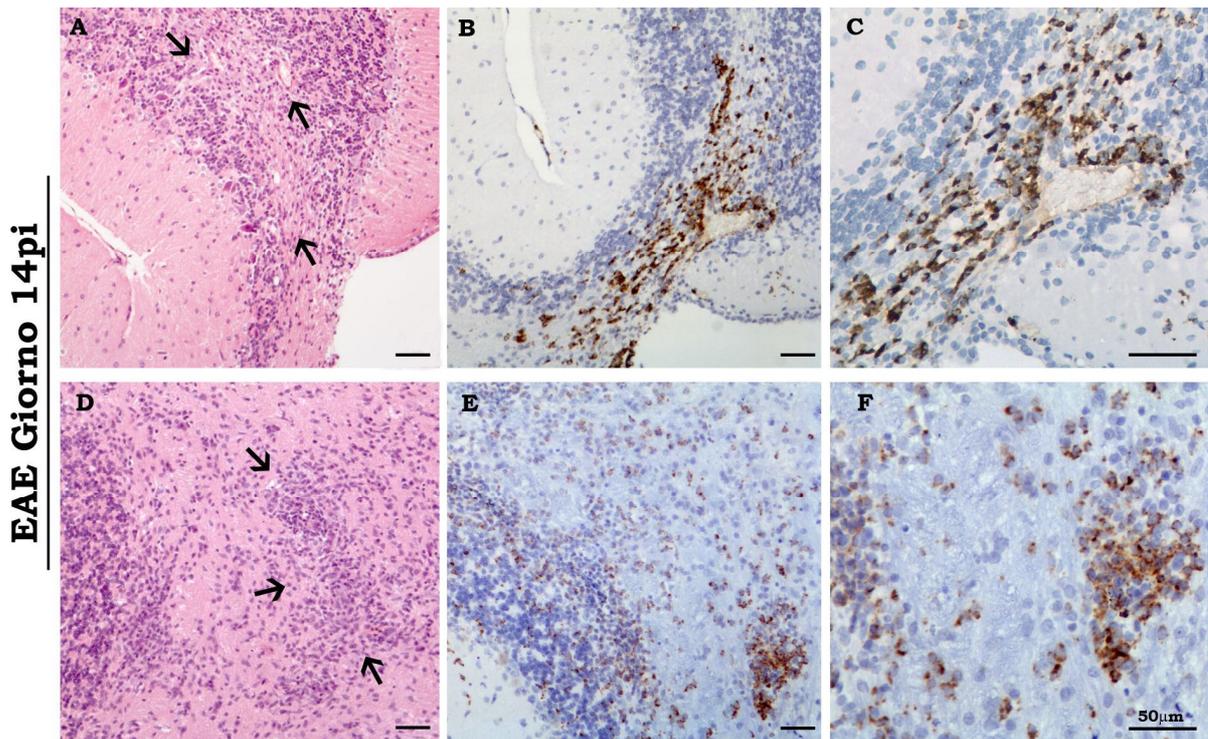


Fig.1.5 Colorazione istologica con Ematossilina-Eosina, analisi immunoistologica per ED1 su sezioni di cervelletto prelevato da ratti affetti da EAE al giorno 14pi. La colorazione con Ematossilina-Eosina mostra la presenza di infiltrati infiammatori nella sostanza bianca del cervelletto (Frecce; A, D). L'immunoistochimica evidenzia cellule macrofagiche ED1⁺ (colorazione marrone) presenti all'interno del focus infiammatorio in entrambi i tessuti cerebellari (B, E). C e F: Ingrandimenti rispettivamente del pannello B ed E. Barra:50µm.

1.2.3 Analisi delle sottopopolazioni leucocitarie

I leucociti infiltranti il midollo spinale di ratti EAE sacrificati al giorno 14pi sono stati analizzati mediante citofluorimetria a flusso al fine di caratterizzare la sottopopolazione linfocitaria.

Come mostrato in Fig.1.6, i linfociti infiltranti sono costituiti in prevalenza da cellule T CD3⁺CD4⁺ (67% delle cellule CD3⁺).

La quantità di leucociti infiltranti estratta dai campioni di midollo spinale prelevati al giorno 45pi è risultata insufficiente per consentire l'analisi citofluorimetrica.

Come da atteso, nei campioni isolati dagli animali sani di controllo, non sono stati identificati linfociti infiltranti.

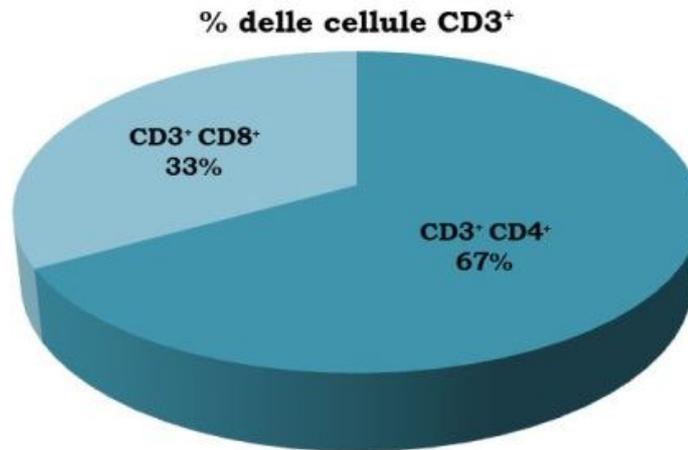


Fig.1.6 Linfociti T (CD3⁺) isolati dal midollo spinale di ratti DA a 14 giorni dall'induzione dell'EAE. I dati sono stati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica e sono espressi come percentuali relative alla totalità dei linfociti T CD3⁺ estratti. Linfociti T CD3⁺CD4⁺: media±SEM=66,05±5,355, n=4; Linfociti T CD3⁺CD8⁺: media±SEM=32,80±5,270, n=4. L'analisi statistica è stata condotta mediante Student's t-Test.

1.2.4 Attivazione della microglia

L'MHC-II viene espresso dalle cellule presentanti l'antigene che nel SNC sono rappresentate da cellule della microglia reattiva o da macrofagi infiltranti (Tapia-Gonzales et al., 2008).

Al fine di approfondire lo studio del profilo neuroimmunologico durante il decorso dell'EAE, abbiamo effettuato un'analisi immunohistologica per individuare le cellule MHC-II⁺ a livello del midollo spinale lombare.

Come mostrato in Fig.1.7 (A-F), abbiamo evidenziato cellule MHC-II⁺ sia nel midollo spinale di animali sani (A, B) che nel midollo spinale di ratti affetti da EAE prelevati al giorno 14pi (C, D) e al giorno 45pi (E, F). Cellule MHC-II⁺ sono state identificate sia nella sostanza bianca che nella sostanza grigia del midollo spinale (A, C, E).

Dal momento che l'anticorpo anti-MHC-II può marcare anche i macrofagi infiltranti, abbiamo osservato le sezioni a maggior ingrandimento in modo da poter apprezzare la morfologia delle cellule MHC-II⁺ (Fig.1.7 B, F). Questa osservazione ci ha permesso di definire che la maggior parte delle cellule immunoreattive a MHC-II presenta morfologia stellata, fornendoci quindi conferma della loro natura microgliale (Tapia-Gonzales et al., 2008, 2011).

Da un punto di vista qualitativo, si osserva una maggior immunoreattività per MHC-II nel midollo spinale di animali affetti da EAE rispetto agli animali sani di controllo e tale differenza si evidenzia sia al giorno 14pi (Fig.1.7 C, D) che al giorno 45pi (Fig.1.7 E, F).

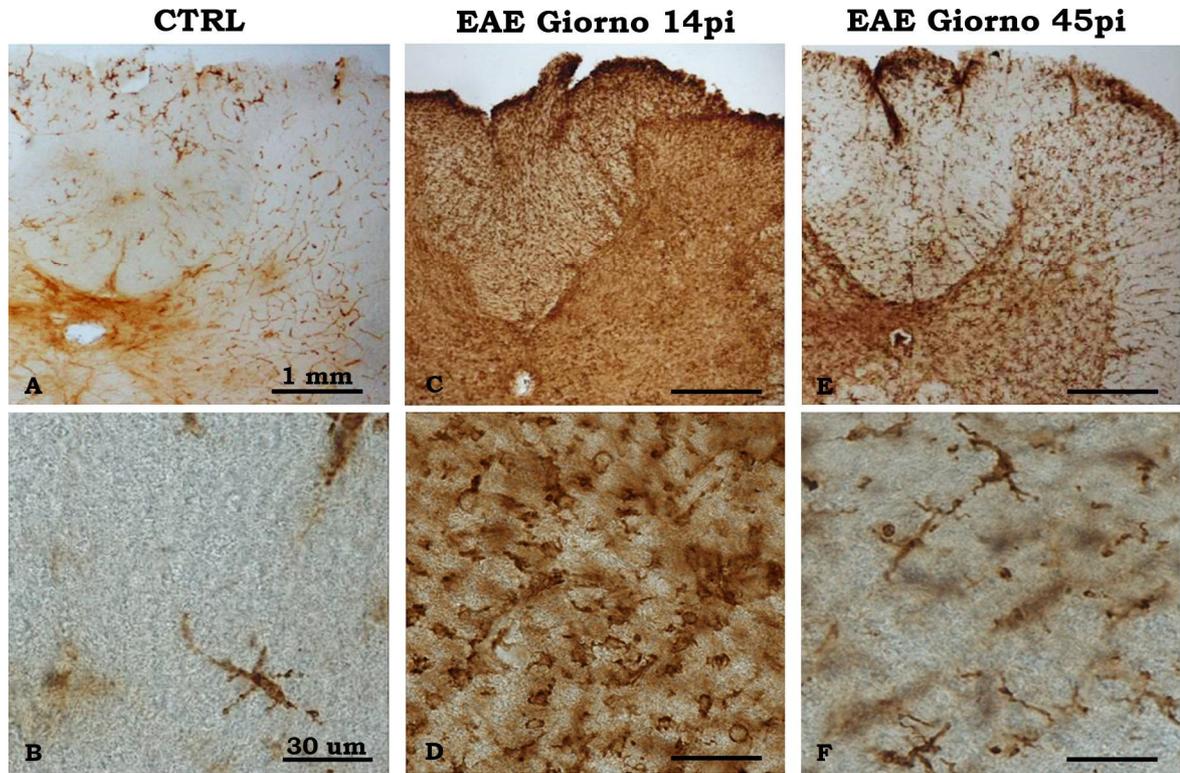


Fig.1.7 Analisi immunoistologica su midollo spinale lombare. L'immunomarcatura effettuata con un anticorpo anti-MHC-II mostra la presenza di cellule immunoreattive (colorazione marrone) in animali sani di controllo (CTRL; A, B) e in animali affetti da EAE sacrificati a 14 giorni dall'induzione (EAE Giorno 14pi; C, D) e a 45 giorni dall'induzione (EAE Giorno 45pi; E, F). Ingrandimento del *funiculus dorsale* della sostanza bianca (B, D, F). Barre: 1mm e 30 μ m.

Al fine di rafforzare il dato qualitativo abbiamo effettuato un'analisi quantitativa delle cellule MHC-II⁺ nella regione della sostanza bianca localizzata tra le corna dorsali del midollo spinale.

Come mostrato in Fig.1.8, tale analisi ci ha consentito di confermare che negli animali affetti da EAE si verifica un aumento significativo nel numero di cellule MHC-II⁺ rispetto agli animali sani di controllo. Tale aumento si osserva sia a picco di malattia che in fase avanzata di malattia anche se al giorno 45pi l'incremento nel numero di cellule MHC-II⁺ è inferiore rispetto a quello osservato al giorno 14pi negli animali affetti da EAE (CTRL: media±SEM=11111±2041, n=10; EAE14pi: media±SEM=68571±5926, n=7; EAE45pi: media±SEM=29827±5332, n=9).

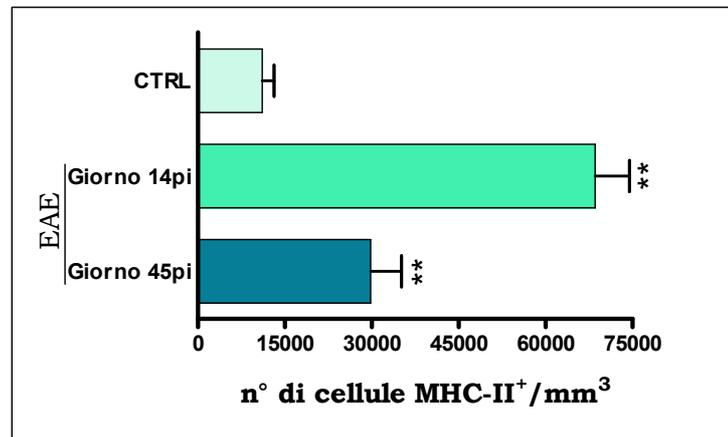


Fig.1.8 Analisi quantitativa di cellule MHC-II⁺ eseguita nel *funiculus* dorsale del midollo spinale di ratti sani di controllo (CTRL) e di animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14 (EAE Giorno 14pi) e al giorno 45 dall'immunizzazione (EAE Giorno 45pi). I dati sono espressi come media ± SEM. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA seguito dal post-hoc test Dunnet's. ** P<0.01 rispetto al CTRL.

1.2.5 Espressione genica di citochine anti-infiammatorie e pro-infiammatorie

Come mostrato in precedenza, le analisi istologiche e citofluorimetriche ci hanno consentito di evidenziare che nel midollo spinale dei ratti DA affetti da EAE il profilo neuroinfiammatorio è caratterizzato dalla presenza d'infiltrati leucocitari (linfociti T CD3⁺ e macrofagi ED1⁺) e dall'attivazione della microglia (MHC-II⁺). Inoltre il grado d'infiltrazione risulta maggiore nei tessuti prelevati dagli animali affetti da EAE al giorno 14pi rispetto a quanto osservato al giorno 45pi.

Il processo infiammatorio è guidato e sostenuto dal rilascio di numerosi mediatori tra cui le citochine che è noto essere coinvolte nel decorso dell'EAE. Al fine di valutare il livello di citochine anti-infiammatorie e pro-infiammatorie nel midollo spinale, abbiamo esaminato l'espressione genica di TGF- β 1 (citochina anti-infiammatoria), di IL-1 β e TNF- α (citochine pro-infiammatorie) tramite Real-time PCR.

Come mostrato in Fig.1.9 (A, B, C), al giorno 14pi l'espressione genica di tutte le citochine prese in esame risulta significativamente maggiore negli animali affetti da EAE rispetto ai controlli sani [TGF- β 1 (CTRL=1; EAE 14pi=4.734; n=6); IL-1 β (CTRL=1; EAE 14pi=13.427; n=6); TNF- α (CTRL=1; EAE 14pi=7.496; n=6)].

Nei campioni di midollo prelevati al giorno 45pi l'espressione delle citochine TGF- β 1 (Fig.1.9A; EAE 45pi=1.493) e TNF- α (Fig.1.9C; EAE 45pi=1.009) torna a livelli confrontabili a quelli dei controlli sani mentre l'espressione genica di IL-1 β , seppur ridotta rispetto a quanto osservato nel midollo al giorno 14pi, permane significativamente più alta rispetto ai controlli sani (Fig.1.9B; EAE 45pi= 6.574).

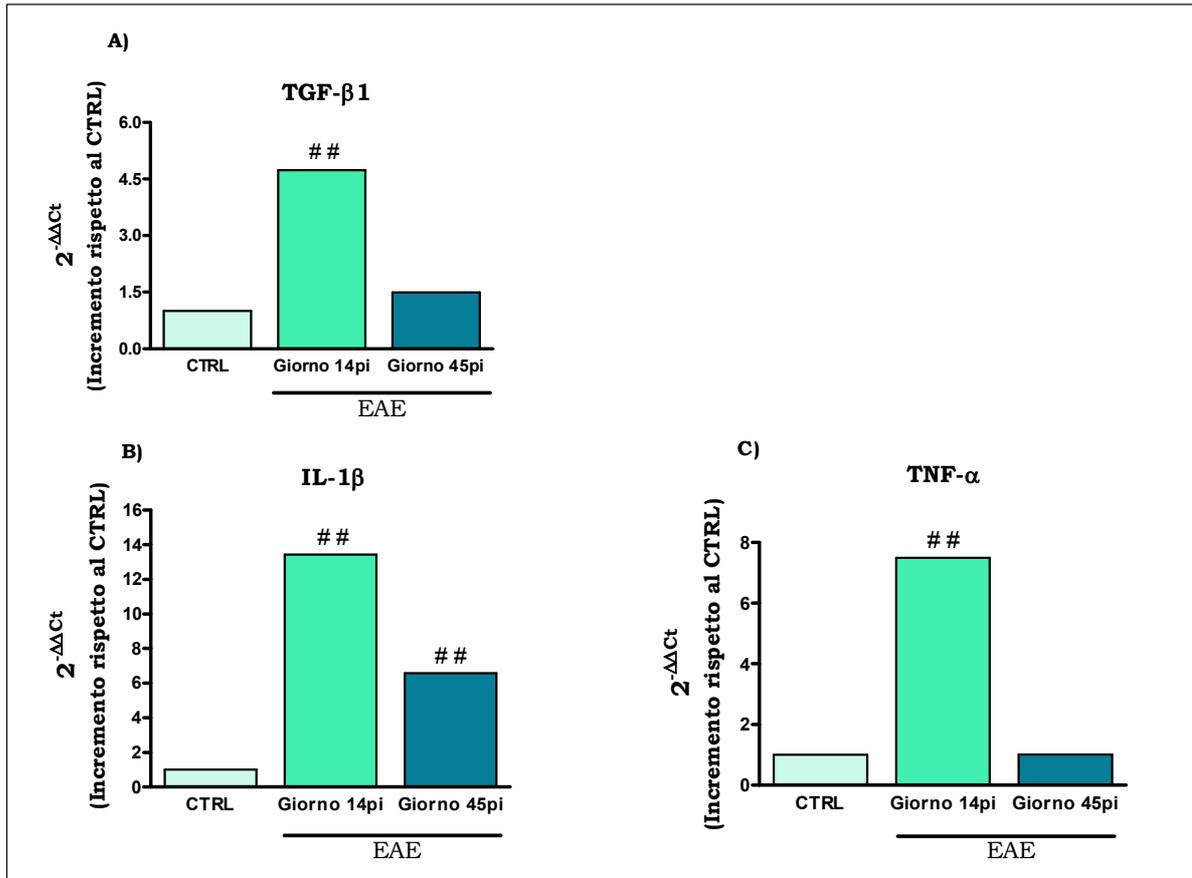


Fig. 1.9 Espressione genica di TGF- β 1 (A), IL-1 β (B) e TNF- α (C) analizzata tramite Real-time PCR nel midollo lombare di animali sani di controllo (CTRL) e di animali affetti da EAE a 14 (EAE Giorno 14pi) e 45 (EAE Giorno 45pi) giorni dall'induzione di malattia. I dati sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione del gene 18s rRNA e sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Il livello di mRNA dei due gruppi sperimentali (EAE Giorno 14pi; EAE Giorno 45pi) è stato rappresentato come incremento di espressione genica rispetto al CTRL. Utilizzando i valori di $\Delta\Delta C_t$ è stato eseguito un test ANOVA a una via seguito dal post-hoc test Dunnet's. ## P<0.01 rispetto al CTRL.

1.3 Demielinizzazione

Accanto alla presenza di neuroinfiammazione, un altro tratto tipico della SM e dell'EAE è rappresentato dalla comparsa di demielinizzazione.

Gli oligodendrociti sono le cellule responsabili della mielinizzazione nel SNC e numerose condizioni patologiche, tra cui la neuroinfiammazione e le malattie autoimmuni, possono danneggiare tali cellule (Merril e Scolding 1999). La guaina mielinica, oltre a garantire la rapida conduzione dell'impulso nervoso (i.e. conduzione saltatoria), fornisce un supporto trofico all'assone ed è quindi essenziale per l'integrità funzionale e per la sopravvivenza dei neuroni (Nave e Trapp, 2008; Schumacher et al., 2012).

La mielina danneggiata può essere sostituita in un processo definito rimielinizzazione, processo che richiede la generazione di oligodendrociti maturi a partire da cellule progenitrici (i.e. OPC).

Durante gli stadi precoci della SM la mielina può essere sostituita. Tuttavia, con il progredire della patologia, la rimielinizzazione degli assoni risulta insufficiente probabilmente a causa di un deficit nel reclutamento e nel differenziamento degli OPC (Schumacher et al., 2012).

Per tali motivi, nel nostro modello di EAE, abbiamo valutato l'eventuale insorgenza di demielinizzazione analizzando l'espressione genica di MBP, la proteina preposta al mantenimento dell'integrità strutturale e della compattezza della guaina mielinica nel SNC (Schumacher et al., 2012).

1.3.1 Espressione genica di MBP

Al fine di valutare l'eventuale comparsa di alterazioni a carico della componente proteica della mielina nel midollo spinale lombare, abbiamo analizzato il livello di espressione genica di due diverse isoforme di MBP tramite tecnica di RNase protection assay. Abbiamo preso in considerazione le due isoforme di MBP da 18.5 kDa e 21.5 kDa, in quanto le sonde disegnate per questo tipo di analisi riconoscono unicamente tali isoforme.

Come mostrato in Fig.1.10 (A, B), l'espressione genica delle due isoforme di MBP risulta significativamente ridotta nel midollo spinale prelevato dagli animali affetti da EAE al giorno 14pi rispetto a quanto osservato negli animali di controllo [MBP 18.5 kDa] (CTRL=1.354±0.0576, n=8; EAE

14pi=0.792±0.1165, n=6); MBP 21.5 kDa (CTRL=0.9963±0.0465, n=8; EAE 14pi=0.76±0.0474, n=6)].

Al giorno 45pi, invece, i livelli di mRNA di entrambe le isoforme di MBP ritornano confrontabili a quelli osservati negli animali sani di controllo [MBP 18.5 kDa (EAE 45pi=1.31±0.0649, n=7); MBP 21.5 kDa (EAE 45pi=1.177±0.0847, n=7)].

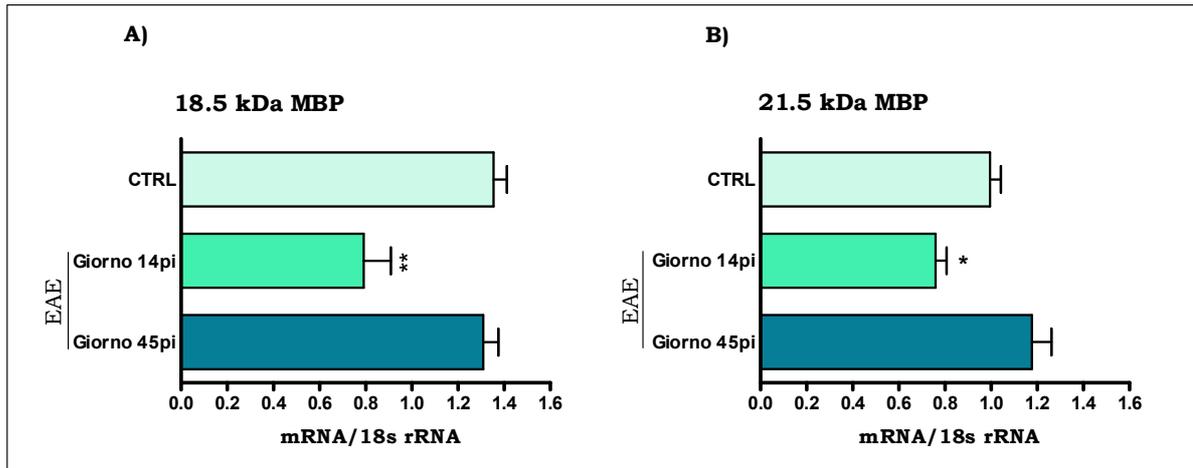


Fig. 1.10 Espressione genica di MBP in animali sani di controllo (CTRL) e affetti da EAE analizzata tramite tecnica Rnase protection assay. I livelli di mRNA dell'isoforma 18.5 kDa (A) e 21.5 kDa (B) di MBP sono stati analizzati nel midollo spinale lombare di animali CTRL e di ratti affetti da EAE sacrificati al giorno 14 (EAE Giorno 14pi) ed al giorno 45 (EAE Giorno 45pi) dall'induzione di malattia. I valori sono espressi come media ± SEM normalizzati rispetto ai valori di 18s rRNA. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA seguito dal post-hoc test Dunnet's.

* P<0.05 e ** P<0.01 rispetto al CTRL.

1.4 Danno assonale

Al fine di valutare la possibile insorgenza di alterazioni della conduttività nervosa nei neuroni spinali di ratti affetti da EAE, abbiamo analizzato l'attività enzimatica della pompa Na^+, K^+ -ATPasica.

La pompa Na^+, K^+ -ATPasica è deputata al ripristino del potenziale di riposo della membrana assonale dopo il passaggio di un impulso nervoso (Lees G.J. et al., 1994).

Quando si ha disfunzione della pompa Na^+, K^+ -ATPasica, l'accumulo assoplasmatico di Na^+ che ne deriva può determinare l'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e può revertire l'attività dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con conseguente accumulo di Ca^{2+} intra-assonale. Un'elevata concentrazione di Ca^{2+} all'interno dell'assone determina l'attivazione di enzimi degradativi, disfunzione mitocondriale, deficit energetico e compromissione del trasporto assonale con conseguente degenerazione dell'assone. Inoltre l'accumulo assoplasmatico di Na^+ rende l'assone cronicamente depolarizzato e ineccitabile (Trapp e Nave, 2008).

L'alterata attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica è quindi indice di danno assonale.

Abbiamo inoltre valutato l'eventuale comparsa di defosforilazione del neurofilamento-H (NF-H) nella sostanza bianca midollare.

La fosforilazione del NF-H è finemente regolata, infatti, nel corpo cellulare e nei dendriti dei neuroni, la fosforilazione è scarsa o assente mentre negli assoni il NF-H è altamente fosforilato (Nixon et al., 1991).

La fosforilazione del NF svolge numerose funzioni fisiologiche: protegge il NF dalla proteolisi, regola il calibro assonale, regola la velocità del trasporto assonale ed è cruciale per la corretta conduzione dell'impulso nervoso.

Per tale motivo alterazioni nel grado di fosforilazione del NF possono determinare cambiamenti strutturali e funzionali dell'assone predisponendolo alla degenerazione (Perrot et al., 2008).

La defosforilazione del NF-H è stata identificata a livello delle lesioni attive e croniche in pazienti affetti da SM (Trapp et al., 1998; Schirmer et al., 2011) e nella sostanza bianca del midollo spinale di animali affetti da EAE (Soulika et al., 2009).

1.4.1 Valutazione dell'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica

Come mostrato in Fig.1.11, negli animali affetti da EAE si osserva una riduzione significativa dell'attività enzimatica della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica rispetto agli animali sani di controllo (CTRL).

La riduzione dell'attività enzimatica si verifica sia al giorno 14 (EAE 14pi) che al giorno 45 dall'induzione di malattia (EAE 45pi), tuttavia tale riduzione risulta maggiore nel midollo spinale degli animali affetti da EAE al giorno 45pi. [CTRL= 56.640±4.279, n=10; EAE 14pi=41.12±4.824, n=7; EAE 45pi=30.00±2.096, n=6].

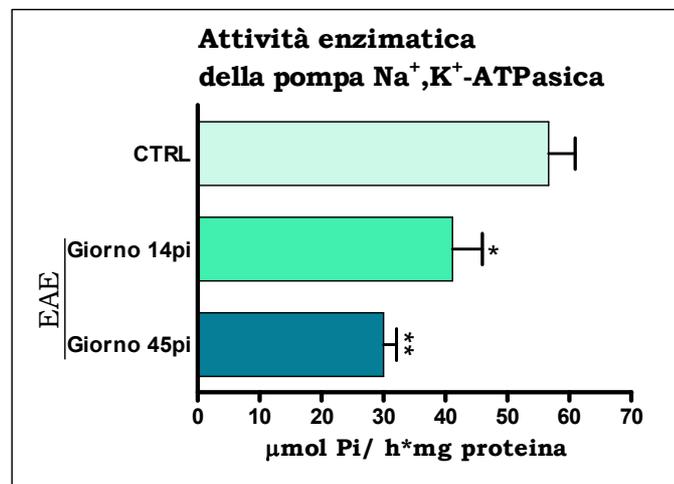


Fig.1.11 Attività enzimatica della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica analizzata nel midollo spinale lombare di animali sani (CTRL) e affetti da EAE sacrificati al giorno 14 (EAE Giorno 14pi) ed al giorno 45 (EAE Giorno 45pi) dall'immunizzazione. I valori di attività misurati come μmol Pi/h * mg proteina sono espressi come media ± SEM. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA seguito dal post-hoc test Dunnet's.

* P<0.05 e ** P<0.01 rispetto al CTRL.

1.4.2 Valutazione della fosforilazione del neurofilamento-H

Al fine di confermare l'insorgenza di assonopatia nei ratti affetti da EAE, abbiamo effettuato un'analisi immunohistologica utilizzando l'anticorpo SMI32 in grado di riconoscere la forma non fosforilata del neurofilamento-H (NF-H).

Come mostrato in Fig.1.12, le immagini a basso ingrandimento (A, C, E) consentono di osservare neuroni immunoreattivi a SMI32 nella sostanza grigia del midollo spinale sia in campioni di controllo (CTRL; A) che negli animali affetti da EAE al giorno 14 (EAE Giorno 14pi; C) e al giorno 45 dall'immunizzazione (EAE Giorno 45pi; E). Ad alto ingrandimento, invece, è possibile apprezzare la presenza di assoni danneggiati (SMI32⁺) negli animali affetti da EAE al giorno 14pi (Fig.1.12 D) e a giorno 45pi (Fig.1.12 F).

Come atteso nel midollo spinale lombare di animali sani non è stata evidenziata la presenza di alcun assone immunoreattivo per SMI32 (Fig.1.12 B). Tuttavia al giorno 14pi si osserva la comparsa di alcuni assoni SMI32⁺ nel midollo spinale di animali affetti da EAE (Fig.1.12 D). Infine, con il progredire della patologia (i.e. EAE Giorno 45pi), si osservano numerosi assoni immunoreattivi per SMI32 (Fig.1.12 F). Tale risultato è stato confermato su tutti i campioni di midollo spinale analizzati (n=5 per CTRL, EAE 14pi, EAE 45pi).

Da un punto di vista qualitativo si osserva quindi una maggior presenza di assoni danneggiati (SMI32⁺) nel midollo spinale di animali affetti da EAE al giorno 45pi (Fig.1.12 E, F) rispetto agli animali affetti da EAE sacrificati al giorno 14 dall'immunizzazione (Fig.1.12 C, D).

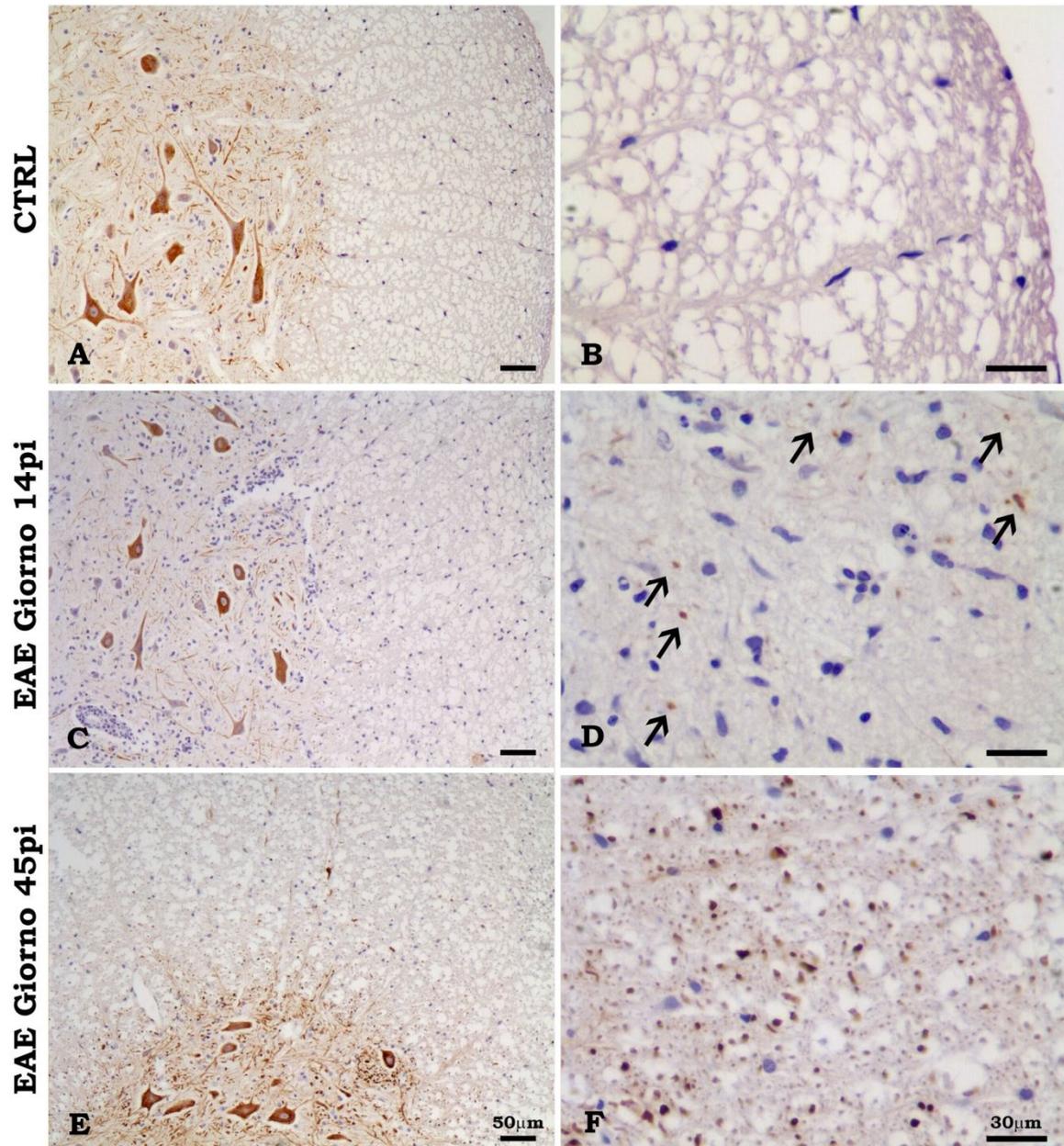


Fig.1.12 Immunolocalizzazione di assoni SMI32⁺ (colorazione marrone) nel midollo spinale lombare di animali sani di controllo (CTRL; A, B) e di animali affetti da EAE sacrificati a 14 giorni dall'immunizzazione (EAE Giorno 14pi; C, D) e a 45 giorni dall'immunizzazione (EAE Giorno 45pi; E, F). Le frecce nel pannello D indicano assoni SMI32⁺. Ingrandimento del *funiculus laterale* della sostanza bianca (B, D, F). Barre: 30µm e 50µm.

1.5 Profilo degli steroidi neuroattivi

Numerose osservazioni cliniche hanno evidenziato la stretta relazione presente tra steroidi sessuali e decorso della SM.

Infatti, l'incidenza e il decorso della patologia mostrano dimorfismo sessuale e durante la gravidanza (i.e. condizione fisiologica caratterizzata da cambiamenti nei livelli plasmatici degli steroidi sessuali) si verifica una riduzione nel tasso di ricadute (Pozzili et al., 1999; El-Etr et al., 2005; Vukusic e Confavreux, 2006). Inoltre l'insorgenza della SM stessa può alterare i livelli plasmatici degli steroidi sessuali (Tomassini et al., 2005; Safarinejad et al., 2008).

Gli ormoni steroidei (i.e. prodotti dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali) ed i neurosteroidi (i.e. sintetizzati da neuroni e glia nel SNC) fanno parte della famiglia degli steroidi neuroattivi (Melcangi e Panzica, 2006b; Melcangi et al., 2008).

Basandosi sulle evidenze cliniche, sono stati condotti due studi in cui è stato dimostrato che il profilo degli steroidi neuroattivi viene modificato nel SNC di animali affetti da EAE sia nelle sua fase di acuzie clinica (Giatti et al., 2010) che nella fase più avanzata di cronicizzazione (Caruso et al., 2010).

Abbiamo dunque deciso di valutare se, nel nostro modello di EAE, fosse possibile osservare una confrontabile modulazione del livello degli steroidi neuroattivi nel midollo spinale.

1.5.1 Livello degli steroidi neuroattivi

Per valutare l'effetto dell'EAE sugli steroidi neuroattivi nel SNC, abbiamo analizzato il livello di tali molecole nel tratto toracico del midollo spinale a fasi diverse del decorso clinico.

Come mostrato in Tabella.1, al giorno 14 dall'immunizzazione (EAE Giorno 14pi) si osserva una prevalente riduzione nel livello degli steroidi neuroattivi presi in esame (riquadri azzurri) rispetto agli animali sani di controllo (CTRL). Nello specifico si è verificata una riduzione significativa nei livelli di pregnenolone (PREG), diidroprogesterone (DHP), isopregnanolone, deidroepiandrosterone (DHEA), diidrotosterone (DHT) e 3 β -diolo rispetto agli animali di controllo.

Inoltre per alcuni degli steroidi neuroattivi considerati, sebbene presente, la riduzione non risulta significativa (riquadri bianchi: PROG e T). Infine, solo il tetraidroprogesterone (THP) e il 17- β estradiolo (17 β -E) subiscono un incremento significativo rispetto agli animali di controllo (riquadri blu).

A 45 giorni dall'induzione dell'EAE (EAE Giorno 45pi), invece, la maggior parte degli steroidi neuroattivi considerati presenta livelli paragonabili a quelli del controllo (riquadri bianchi) fatta eccezione per il PREG ed il 3 β -diolo (riquadri azzurri) che, come osservato al giorno 14pi, presentano ancora un livello significativamente inferiore rispetto agli animali di controllo.

Di particolare interesse risulta la modulazione subita dal PROG (riquadro rosso) essendo l'unico steroide neuroattivo che non subisce variazioni significative al giorno 14pi e che, solo in fase avanzata di patologia (EAE Giorno 45pi), si riduce in modo significativo rispetto al controllo.

	CTRL	EAE Giorno 14pi	EAE Giorno 45pi
PREG	23 ± 2.1	14 ± 1.7 *	13 ± 1.9 **
PROG	6.2 ± 1.8	3.5 ± 0.76	0.40 ± 0.04 **
DHP	51 ± 4.1	22 ± 2.4 ***	49 ± 4.6
THP	3.0 ± 0.51	6.7 ± 0.73 ***	2.2 ± 0.65
ISOPREGNANOLONE	2.0 ± 0.34	0.28 ± 0.13 *	1.9 ± 0.72
DHEA	0.37 ± 0.05	0.12 ± 0.02 *	0.25 ± 0.08
T	2.7 ± 0.81	0.96 ± 0.34	1.0 ± 0.26
DHT	0.89 ± 0.14	0.39 ± 0.09 *	0.76 ± 0.1
3α-diolo	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.04	< 0.05
3β-diolo	0.26 ± 0.06	0.11 ± 0.03 *	< 0.05 **
17α-E	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	< 0.02
17β-E	0.03 ± 0.007	0.11 ± 0.04 *	0.03 ± 0.005

Tabella.1 Livello di steroidi neuroattivi nel midollo spinale di animali sani di controllo (CTRL) e affetti da EAE. Il livello di steroidi neuroattivi è stato determinato tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS) sul tratto toracico del midollo spinale isolato da animali sani di CTRL e da animali affetti da EAE a 14 e 45 giorni dall'induzione di malattia (EAE Giorno 14pi; EAE Giorno 45pi). I dati sono espressi come pg/mg di tessuto ± SEM (n=10 per i CTRL, n=7 per EAE Giorno 14pi, n=6 per EAE Giorno 45pi). I valori 0.05 e 0.02 pg/mg di tessuto indicano i limiti di detezione rispettivamente per il 3 α -diolo/3 β -diolo e per il 17 α -E. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA seguito dal post-hoc test Dunnet's. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 rispetto agli animali di CTRL.

1.5.2 Espressione degli enzimi steroidogenici

Al fine di determinare se la modulazione degli steroidi neuroattivi fosse associata a una variazione nella loro biosintesi locale, abbiamo analizzato l'espressione genica di due enzimi steroidogenici nel midollo spinale: la 5 α -reduttasi (5 α -R) e la 3 α -idrossisteroidodeidrogenasi (3 α -HSD).

Come mostrato in Fig.1.13 A, negli animali affetti da EAE al giorno 14pi si osserva una riduzione nell'espressione genica della 5 α -R, l'enzima in grado di convertire il PROG in DHP e il T in DHT [5 α -R (CTRL:2^{- $\Delta\Delta$ Ct}=1, n=6; EAE 14pi: 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} =0.615, n=6)]. Tale riduzione correla con i ridotti livelli di DHP e DHT osservati nel midollo spinale di animali affetti da EAE al giorno 14pi (Tabella.1).

Inoltre l'aumento nell'espressione genica della 3 α -HSD (Fig.1.13 B), l'enzima che converte il DHP in THP, si associa all'aumento nel livello del THP osservato nel midollo spinale di animali affetti da EAE al giorno 14pi (Tabella.1) [3 α -HSD (CTRL: $2^{-\Delta\Delta Ct}=1$, n=6; EAE 14pi: $2^{-\Delta\Delta Ct}=2.784$, n=6)].

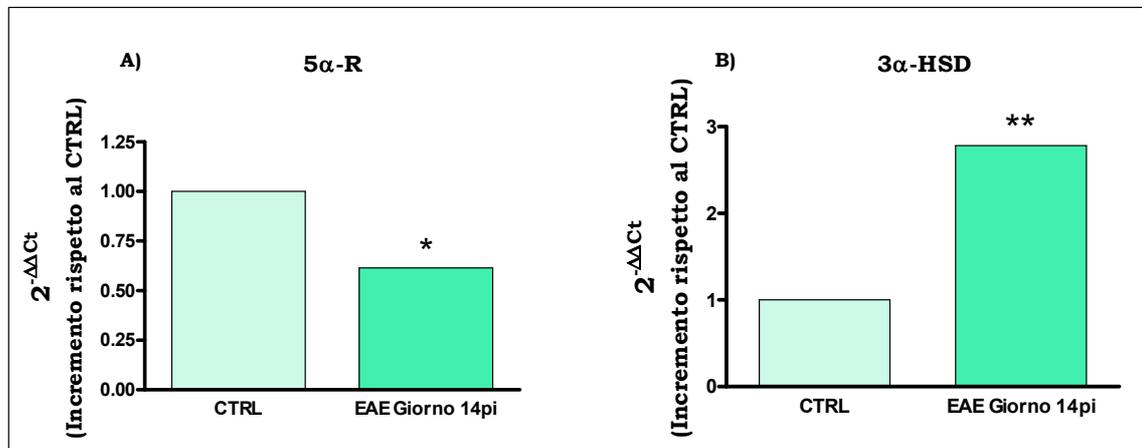


Fig.1.13 Espressione genica di 5 α -R (A) e 3 α -HSD (B) analizzata tramite Real-time PCR nel midollo lombare di animali sani di controllo (CTRL) e di animali affetti da EAE a 14 giorni dall'induzione di malattia (EAE Giorno 14pi). I dati sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione del gene 18s rRNA (ΔCt) e sono stati espressi come differenza rispetto al ΔCt dei campioni di CTRL ($\Delta\Delta Ct$). In grafico i valori sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Utilizzando i valori di $\Delta\Delta Ct$ è stato eseguito uno Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ rispetto al CTRL.

Parte dei risultati presentati sono stati pubblicati in:

Giatti S., Boraso M., Abbiati F., Ballarini E., Calabrese D., Santos-Galindo M., Rigolio R., Pesaresi M., Caruso D., Viviani B., Cavaletti G., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2012. *Multimodal Analysis in Acute and Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. J. Neuroimmune Pharmacol. Doi: 10.1007/s11481-012-9385-9.

2. RUOLO NEUROPROTETTIVO DEL PROGESTERONE NEL MODELLO DI EAE IN RATTI DARK AGOUTI

I risultati ottenuti fino a questo punto ci hanno consentito di dimostrare che la modulazione del profilo neuroinfiammatorio e degli steroidi neuroattivi è strettamente correlata con la progressione dell'EAE.

L'analisi dei livelli di steroidi neuroattivi eseguita nel midollo spinale ha messo in evidenza che la cronicizzazione della patologia si accompagna ad una spiccata riduzione nei livelli di progesterone (PROG).

Il PROG è un noto immunosoppressore in grado di influenzare eventi infiammatori in differenti condizioni neurodegenerative (Feeseer e Loria., 2011; Garay et al., 2011; Labombarda et al., 2011) e di promuovere la rimielinizzazione (Ghoumari et al., 2005; Labombarda et al., 2009).

Inoltre il PROG è in grado di migliorare il decorso clinico della forma acuta di EAE riducendo l'infiltrazione leucocitaria, le placche di demielinizzazione ed il danno assonale (Garay et al., 2007, 2009).

Abbiamo dunque ipotizzato che la riduzione dei livelli di PROG osservata a fasi avanzate dell'EAE (i.e. giorno 45pi) possa essere coinvolta nella cronicizzazione della patologia e sia in grado di compromettere i processi rigenerativi.

Sulla base di queste osservazioni abbiamo condotto un secondo studio con lo scopo di valutare se il trattamento protratto con PROG potesse avere un effetto neuroprotettivo sull'EAE indotta in ratti Dark Agouti (DA).

Tutte le analisi sono state eseguite al giorno 45pi dal momento che la riduzione di PROG a livello del midollo spinale è risultata significativa solo a fasi avanzate della patologia. Inoltre effettuare le analisi su animali che abbiano manifestato più di una fase di remissione/ricaduta rende le osservazioni rilevanti da un punto di vista clinico in quanto tale modello sperimentale ricalca la forma Recidivante-Remittente di Sclerosi Multipla (i.e. SM-RR).

2.1 Effetto del PROG sul decorso clinico dell'EAE

Dal momento che il PROG viene fortemente ridotto nel midollo spinale di animali affetti da EAE durante la cronicizzazione di malattia, abbiamo deciso di somministrare 1mg di PROG/ratto sottocute (s.c.) a partire dal giorno di induzione dell'EAE e fino al giorno 44pi (i.e. 24 ore prima del sacrificio). Abbiamo indotto l'EAE in 16 animali, 8 dei quali sono stati trattati con PROG ad una frequenza di giorni alterni per un totale di 21 iniezioni.

Ai rimanenti 8 animali immunizzati è stato somministrato soltanto il veicolo in cui viene disciolto il PROG (i.e. 200 μ l di olio di sesamo). Il veicolo è stato somministrato anche in 8 animali di controllo in cui non è stata indotta l'EAE. Tutti gli animali sono stati sacrificati al giorno 45pi.

La schedula di trattamento è stata stabilita in conformità a studi precedenti condotti dal nostro gruppo di ricerca (Leonelli et al., 2007).

Al fine di monitorare il decorso clinico dell'EAE nei ratti DA, abbiamo eseguito una valutazione dei sintomi neurologici partendo dal giorno 9pi e fino al giorno 45pi secondo una scala che attribuisce valori crescenti a gradi crescenti di disabilità motoria (score clinico).

Come mostrato in Fig.2.1, sia gli animali affetti da EAE trattati con veicolo (curva blu) che quelli trattati con PROG (curva viola) raggiungono il picco di malattia (i.e. massimo di gravità clinica) intorno al dodicesimo giorno dall'induzione dell'EAE. In entrambi i gruppi si osserva una prima fase di remissione seguita da una successiva riacutizzazione di malattia che si manifesta intorno al giorno 20pi negli animali affetti da EAE e trattati con PROG (EAE+PROG) e tra il giorno 21-24pi negli animali affetti da EAE e trattati con il veicolo (EAE+V). Successivamente gli animali affetti da EAE+V mostrano un decorso cronico caratterizzato da diverse fasi di remissione e di riacutizzazione sintomatologica (giorno 30pi, giorno 37-38pi e giorno 43pi) mentre negli animali affetti da EAE e trattati con PROG si verifica un generale miglioramento nell'outcome neurologico. Infatti, in questo gruppo sperimentale, la media dello score clinico oscilla intorno a valori inferiori ad 1 fino al termine dell'osservazione.

L'inserito presente in Fig.2.1 rappresenta l'indice cumulativo di malattia (ICM) e rende evidente che il trattamento con PROG è in grado di ridurre in

modo significativo l'ICM rispetto agli animali EAE trattati con veicolo [ICM (EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 1.000 \pm 0.1012$, $n=8$; EAE+P: $\text{media} \pm \text{SEM} = 0.6114 \pm 0.1006$, $n=8$)].

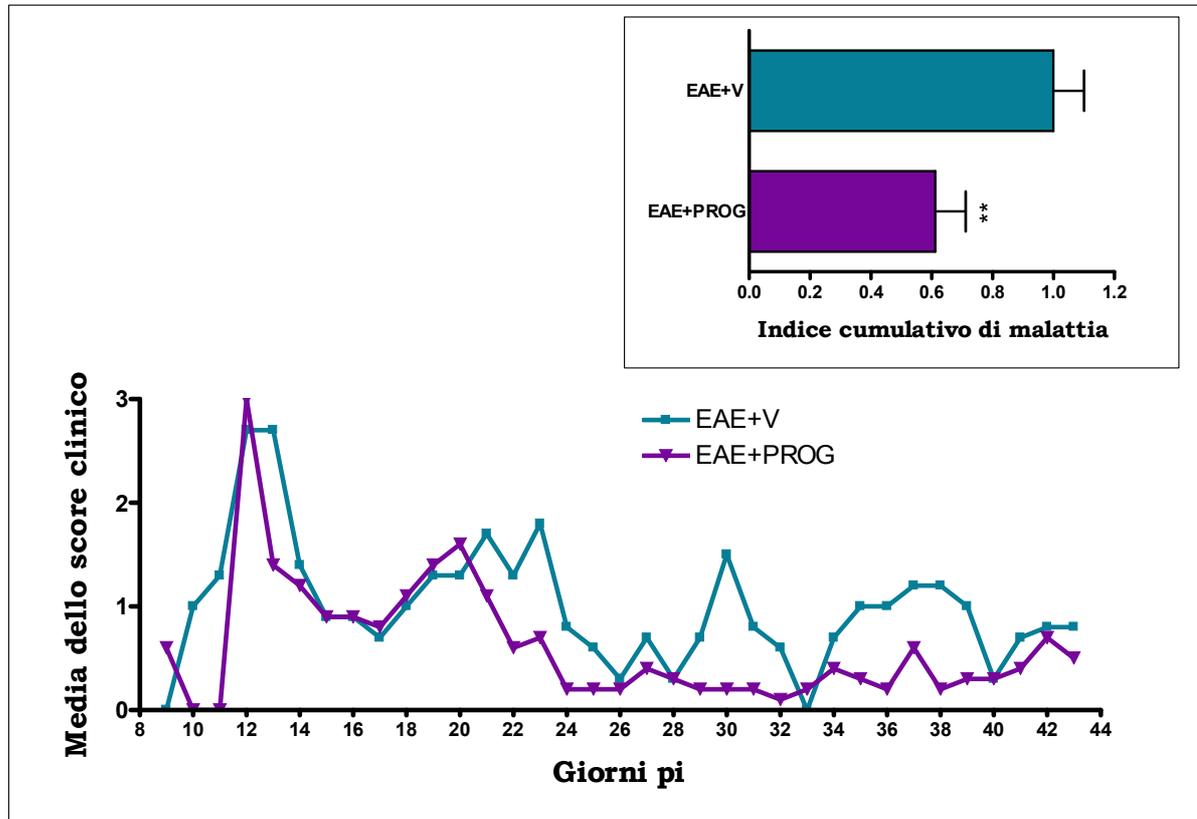


Fig.2.1 Effetto del trattamento con PROG sul decorso clinico dell'EAE in ratti DA. Andamento del decorso clinico in ratti affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V; quadrato/curva blu) e trattati con progesterone (EAE+PROG; triangolo/curva viola). I dati sono espressi come media dello score clinico.

Inserto: Indice cumulativo di malattia calcolato come media della somma degli score clinici di animali valutati sull'intero periodo di osservazione. I Dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ e sono stati analizzati mediante Student's t-test. ** $P < 0.01$ rispetto agli animali EAE+V. Giorni pi: Giorni dall'immunizzazione.

2.2 Profilo neuroimmunologico

In primo luogo abbiamo analizzato la possibile capacità del PROG di modulare la risposta neuroinfiammatoria a livello del midollo spinale di animali affetti da EAE.

A tal fine sono state eseguite analisi immunoistologiche per identificare la presenza di infiltrati macrofagici e di cellule della microglia attivata. Inoltre è stato analizzato il profilo di espressione genica di citochine pro- ed anti-infiammatorie.

2.2.1 Effetto del PROG sull'infiltrazione infiammatoria

Per l'analisi istologica abbiamo prelevato una porzione del rigonfiamento lombare del midollo spinale da ciascun gruppo sperimentale (CTRL, EAE+V ed EAE+PROG) al giorno 45pi. Il tessuto è stato incluso in paraffina e sono state eseguite delle sezioni seriali di 5µm colorate con Ematossilina-Eosina al fine di identificare l'eventuale presenza di infiltrati infiammatori.

Abbiamo inoltre effettuato un'immunomarcatura per ED1 al fine di individuare l'eventuale presenza di cellule con attività macrofagica.

A conferma di quanto già osservato nella parte sperimentale dedicata alla caratterizzazione del modello (Vd. Paragrafo 1.2.1), al giorno 45pi la colorazione istologica con Ematossilina-Eosina non ha consentito di rilevare la presenza di infiltrati leucocitari né a livello del midollo spinale di animali affetti da EAE+V né in quelli trattati con PROG.

Tuttavia, l'immunomarcatura per ED1 ci ha consentito di evidenziare la presenza di cellule macrofagiche (ED1⁺) a livello della sostanza bianca del midollo spinale in entrambi i gruppi sperimentali (Fig.2.2 A-F).

Analizzando le sezioni seriali su cui è stata effettuata la marcatura, abbiamo osservato che, nel midollo spinale di animali affetti da EAE+V (Fig.2.2 C, D), 7 campioni degli 8 analizzati mostrano cellule immunoreattive per ED1 mentre negli animali affetti da EAE trattati con PROG, soltanto in 3 campioni di midollo (n=8) è stato possibile individuare cellule ED1⁺ (Fig.2.2 E, F).

Nei tessuti prelevati dagli animali sani di controllo non abbiamo individuato cellule macrofagiche ED1⁺ (Fig.2.2 A, B).

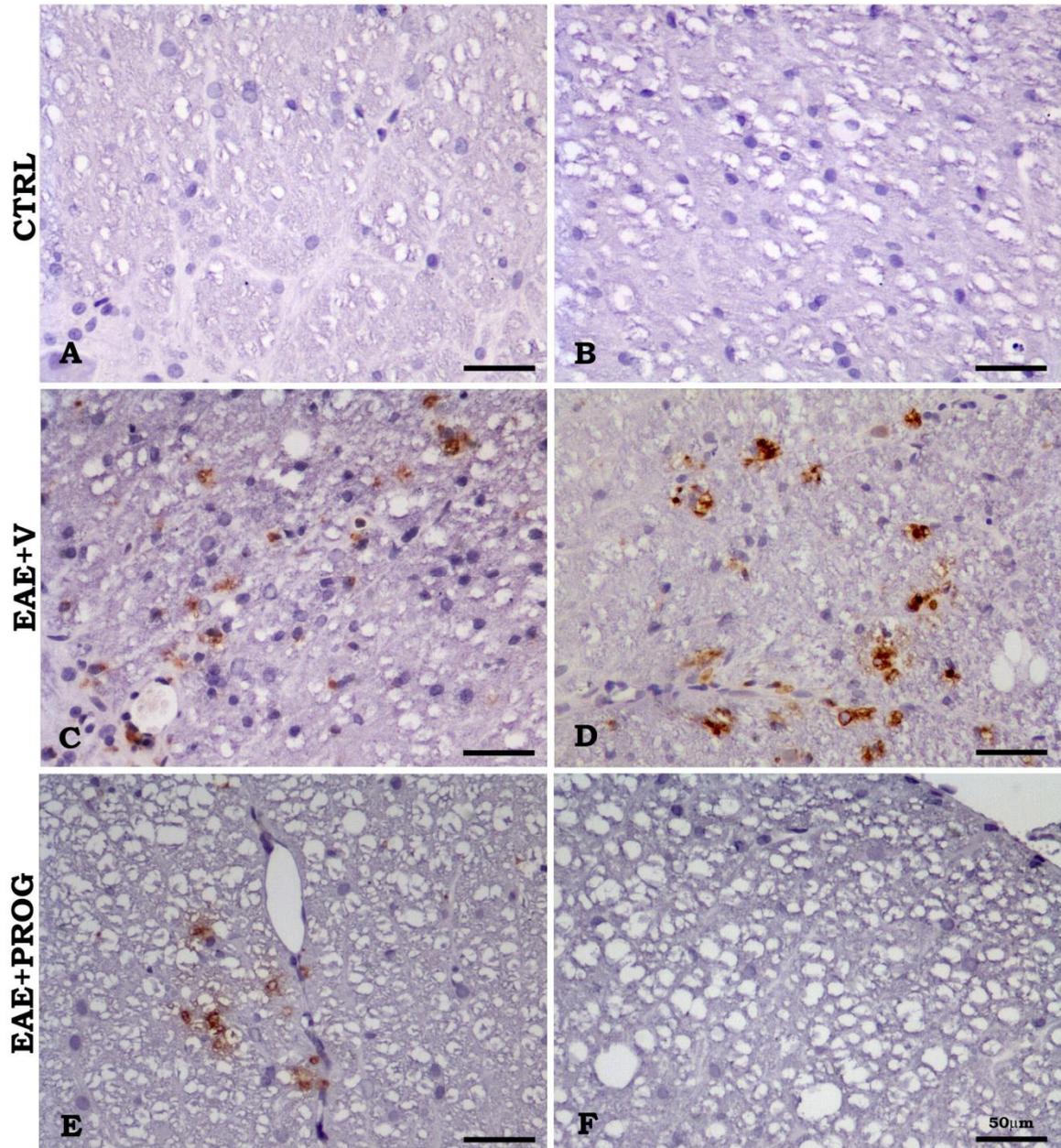


Fig.2.2 Analisi immunoistologica su midollo spinale lombare. La marcatura effettuata con un anticorpo anti-ED1 mostra la presenza di cellule macrofagiche ED1⁺ (colorazione marrone) a livello della sostanza bianca del midollo spinale in animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V; C, D) o con progesterone (EAE+PROG; E, F). La maggior parte delle porzioni di midollo lombare isolate da animali affetti da EAE+PROG è priva di cellule immunoreattive per ED1 (F: immagine rappresentativa). Il midollo spinale isolato da animali sani di controllo (CTRL) non mostra cellule macrofagiche ED1⁺ (A, B). Barra: 50µm.

2.2.2 Effetto del PROG sull'attivazione della microglia

Al fine di valutare lo stato di attivazione della microglia, nel tratto lombare del midollo spinale abbiamo effettuato un'immunomarcatura per MHC-II.

Come mostrato in Fig.2.3, la marcatura ci ha consentito di rivelare la presenza di cellule MHC-II⁺ sia nella sostanza bianca che nella sostanza grigia del midollo spinale (Fig.2.3 A, C, E). E' possibile però osservare una differenza tra i diversi gruppi sperimentali. Nello specifico, gli animali affetti da EAE (EAE+V; C, D) mostrano una maggiore immunoreattività per MHC-II rispetto agli animali sani di controllo (CTRL; A, B). Tuttavia, da un punto di vista qualitativo, è possibile osservare come il trattamento con PROG determina una ridotta immunoreattività per MHC-II rispetto a quanto osservato negli animali affetti da EAE+V (Fig.2.3 E, F).

Poiché la maggior parte delle cellule MHC-II⁺ mostra morfologia stellata (Fig.2.3 B, D) è possibile sostenere che tali cellule rappresentino microglia attivata (Tapia-Gonzales et al., 2008, 2011).

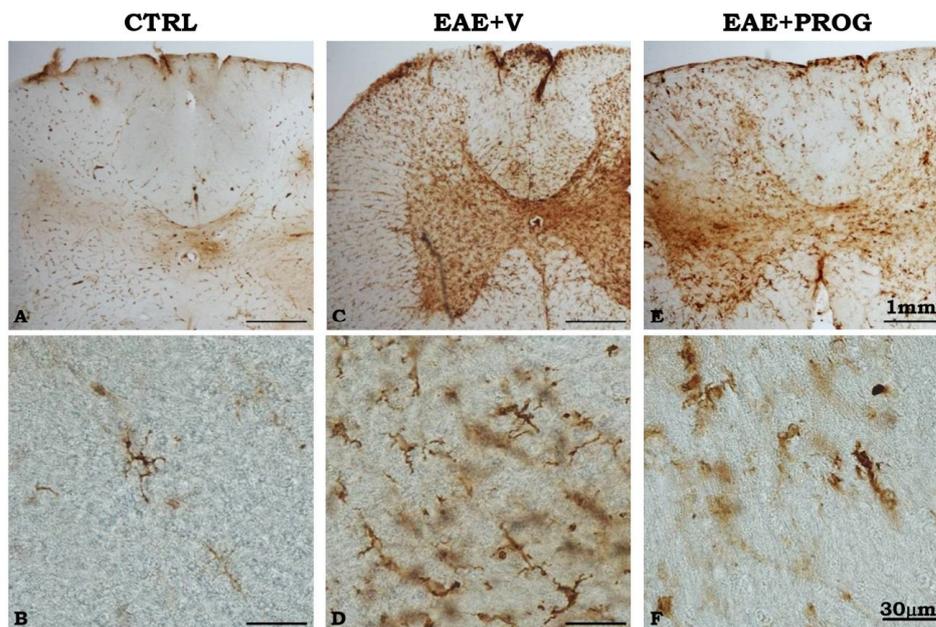


Fig.2.3 Analisi immunoistologica su midollo spinale lombare. L'immunomarcatura effettuata con anticorpo anti-MHC-II mostra la presenza di cellule immunoreattive (colorazione marrone) in animali sani (CTRL; A, B) e in animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V; C, D) o con PROG (EAE+PROG; E, F). Tutti gli animali sono stati sacrificati a 45 giorni dall'immunizzazione. Ingrandimento della regione dorsale della sostanza bianca (B, D, F). Barre: 1mm e 30µm.

A sostegno delle osservazioni qualitative emerse tramite immunomarcatura, abbiamo effettuato un'analisi quantitativa delle cellule MHC-II⁺ nella regione della sostanza bianca localizzata tra le corna dorsali del midollo spinale. Come mostrato in Fig.2.4, il numero di cellule MHC-II⁺ risulta significativamente aumentato nei ratti affetti da EAE rispetto agli animali sani di CTRL (CTRL: media±SEM= 7111±1487, n=7; EAE+V: media±SEM= 29827±5332, n=8). L'analisi morfometrica evidenzia inoltre che il trattamento con PROG è in grado di ridurre in modo significativo il numero di cellule immunoreattive per MHC-II rispetto al gruppo di animali affetti da EAE+V (EAE+PROG: media±SEM=15492±1112, n=7).

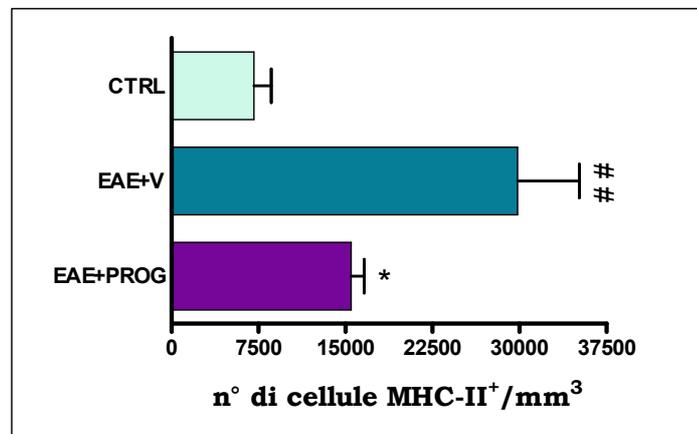


Fig.2.4 Analisi quantitativa del numero di cellule MHC-II⁺/mm³ effettuata nella porzione dorsale della sostanza bianca di animali sani (CTRL), di ratti affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V) e di animali affetti da EAE trattati con progesterone (EAE+PROG). I dati rappresentano la media ± SEM e sono stati analizzati mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Tukey's. ## P<0.01 rispetto al CTRL; * P<0.05 rispetto agli animali EAE+V.

2.2.3 Effetto del PROG sull'espressione genica di citochine pro- e anti-infiammatorie

L'attivazione delle cellule della microglia ha come conseguenza il rilascio di mediatori tra cui citochine pro- e anti-infiammatorie. Avendo osservato una diminuzione nel numero di cellule MHC-II⁺, e quindi una ridotta attivazione della microglia in seguito a trattamento con PROG, abbiamo ipotizzato che tale trattamento potesse avere anche un effetto modulante sull'espressione delle citochine. Abbiamo quindi valutato l'espressione genica di TGF- β 1 (citochina anti-infiammatoria), di IL-1 β e di TNF- α (citochine pro-infiammatorie) a livello del midollo spinale lombare di animali sani e affetti da EAE trattati con veicolo o con PROG.

Come mostrato in Fig.2.5 A, l'espressione genica di TGF- β 1 è aumentata negli animali affetti da EAE+V rispetto agli animali sani ma tale incremento non risulta statisticamente significativo. Il trattamento con PROG determina invece una riduzione significativa nei livelli di espressione genica di TGF- β 1 rispetto agli animali affetti da EAE+V (CTRL: media \pm SEM=0.4 \pm 0.1139, n=7; EAE+V: media \pm SEM=0.6233 \pm 0.1204, n=6; EAE+PROG: media \pm SEM=0.2729 \pm 0.0255, n=7).

I livelli di mRNA dell'IL-1 β aumentano in modo significativo negli animali affetti da EAE+V rispetto agli animali di controllo mentre il trattamento con PROG ne determina una significativa riduzione (CTRL: media \pm SEM= 0.0471 \pm 0.0074, n=7; EAE+V: media \pm SEM=0.23 \pm 0.0428, n=6; EAE+PROG: media \pm SEM=0.1086 \pm 0.0122, n=7) (Fig.2.5 B).

Un andamento analogo a quello dell'IL-1 β è stato osservato per l'espressione genica di TNF- α sebbene non sia stata raggiunta la significatività statistica.

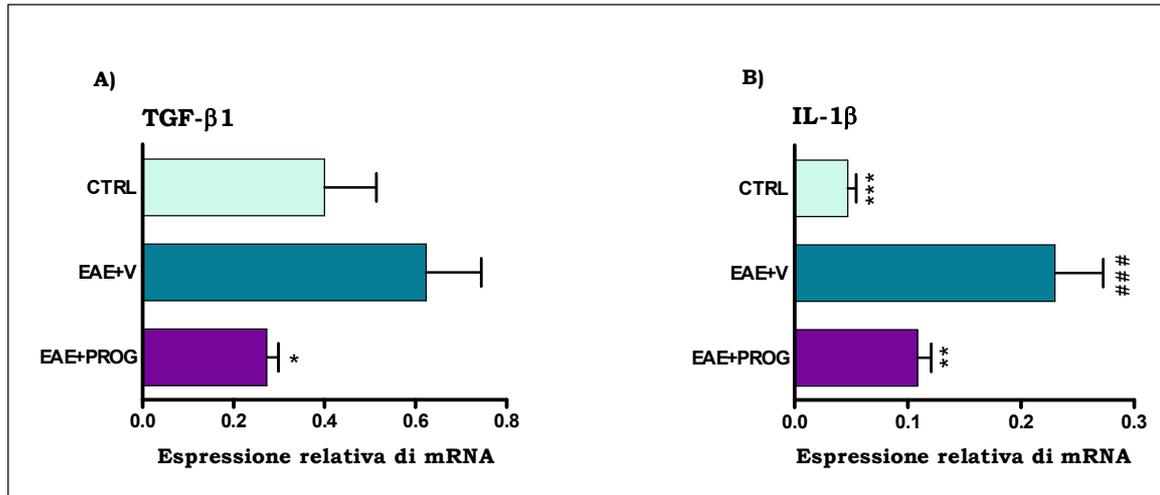


Fig.2.5 Espressione genica delle citochine TGF-β1 (A) e IL-1β (B) in animali di controllo (CTRL) e in animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V) o con progesterone (EAE+PROG). L'espressione genica è stata determinata mediante Real-time PCR a livello del midollo spinale lombare di animali CTRL e affetti da EAE sacrificati al giorno 45pi. L'espressione genica viene espressa come media ± SEM e i dati sono stati analizzati mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Tukey's. ### P<0.001 rispetto al CTRL; * P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001 rispetto ai ratti affetti da EAE+V.

2.3 Demielinizzazione

Come affermato in precedenza, durante gli stadi precoci della SM, il danno subito dalla guaina mielinica può essere riparato. Tuttavia, con il progredire della patologia, la rimielinizzazione degli assoni risulta insufficiente.

Per tale motivo la stimolazione dei processi di rimielinizzazione rappresenta attualmente una delle principali sfide nella terapia della SM (Schumacher et al., 2012).

Come evidenziato in studi condotti su modelli murini di EAE, il trattamento con PROG in fase acuta di patologia è in grado di stimolare la mielinizzazione (Garay et al., 2007, 2012).

In questo studio abbiamo indagato il possibile effetto pro-mielinizzante del PROG in un modello cronico di EAE analizzando l'espressione proteica di MBP, una delle proteine più abbondanti nella guaina mielinica.

2.3.1 Analisi immunohistologica per MBP

Al fine di valutare se il trattamento con PROG abbia degli effetti sulla componente proteica della mielina, abbiamo effettuato un'immunomarcatura per MBP (i.e. isoforma da 21.5 kDa) su sezioni seriali di midollo spinale lombare di animali sani e di animali affetti da EAE trattati o meno con PROG. L'eventuale assenza di marcatura nella sostanza bianca del midollo spinale è indice della presenza di aree di demielinizzazione.

Come da atteso, nel midollo isolato da animali sani (CTRL), non abbiamo identificato alcuna area di demielinizzazione (Fig.2.6 A, B).

Tuttavia lo stesso quadro immunohistologico è stato osservato anche sulle sezioni midollari appartenenti ad animali affetti da EAE trattati solo con veicolo (EAE+V; C, D). Inoltre il trattamento con PROG non ha apportato alcuna alterazione in tale quadro istologico (EAE+PROG; E, F).

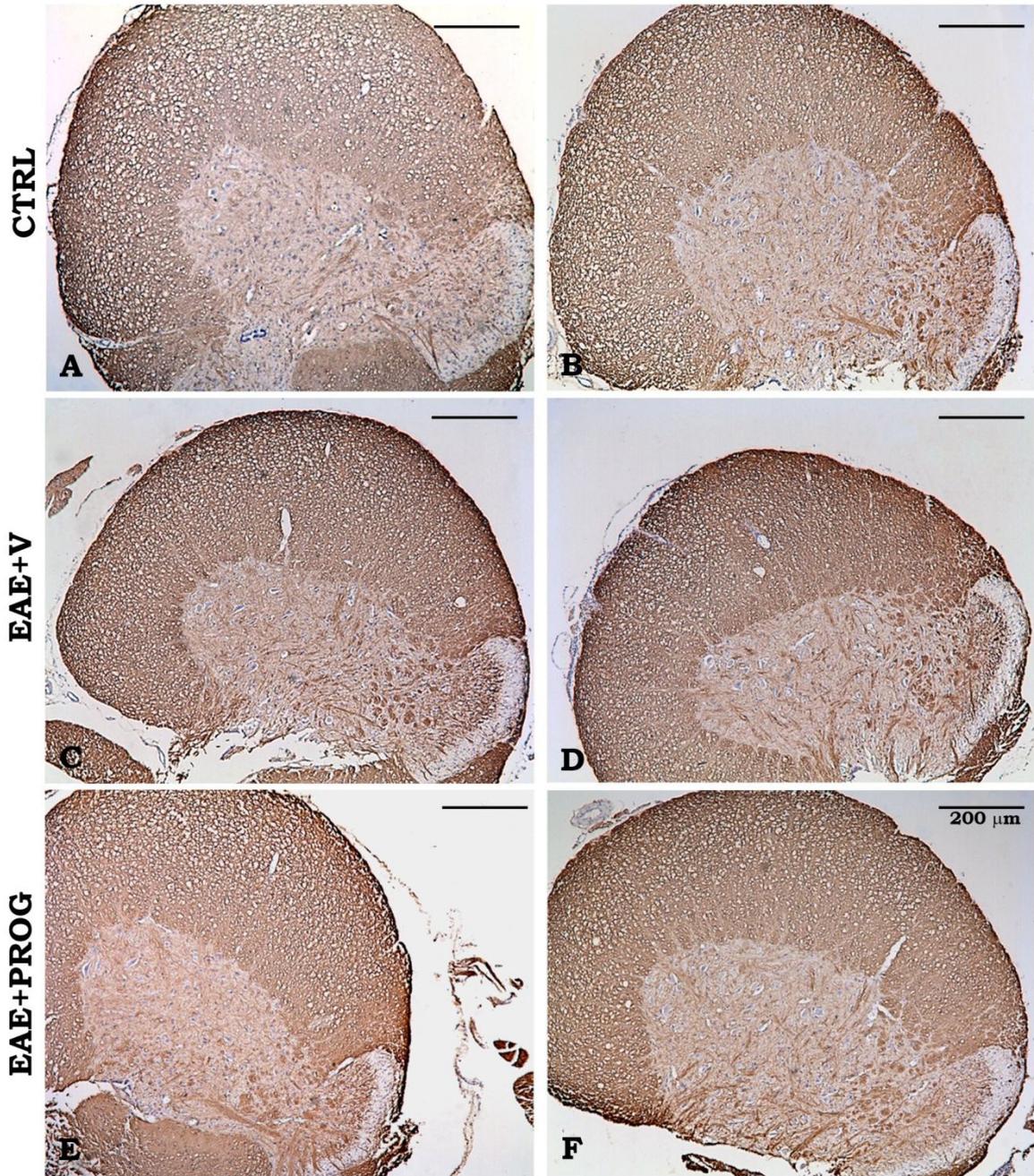


Fig.2.6 Analisi immunoistologica per MBP (isoforma da 21.5 kDa) su midollo spinale lombare di animali sani (CTRL; A, B) e di animali affetti da EAE e trattati con veicolo (EAE+V; C, D) o con progesterone (EAE+PROG; E, F). Le immagini esemplificative mostrano sezioni di midollo spinale in cui la sostanza bianca è priva di aree demielinizzate. Barra: 200µm.

2.3.2 Effetto del PROG sull'espressione proteica di MBP

Per la messa a punto dell'analisi immunohistologica abbiamo utilizzato un anticorpo in grado di riconoscere solo l'isoforma da 21.5 kDa di MBP.

Dato il risultato inatteso, abbiamo deciso di effettuare un'analisi dell'espressione proteica utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere anche le altre isoforme di MBP.

L'espressione proteica di MBP è stata valutata a livello del midollo spinale lombare di animali sani e affetti da EAE trattati o meno con PROG.

Come mostrato in Fig.2.7, negli animali affetti da EAE si osserva una significativa riduzione nell'espressione proteica di MBP (18.5 kDa) e il trattamento con PROG riporta i livelli di MBP a valori confrontabili con il controllo (CTRL: $\text{media} \pm \text{SEM} = 165.6 \pm 17.50$, $n=6$; EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 100 \pm 14.23$, $n=6$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 166 \pm 19.60$, $n=6$).

Il livello proteico dell'isoforma da 21.5 kDa di MBP mostra un andamento analogo a quanto osservato per l'isoforma da 18.5 kDa, tuttavia non è stata raggiunta la significatività statistica.

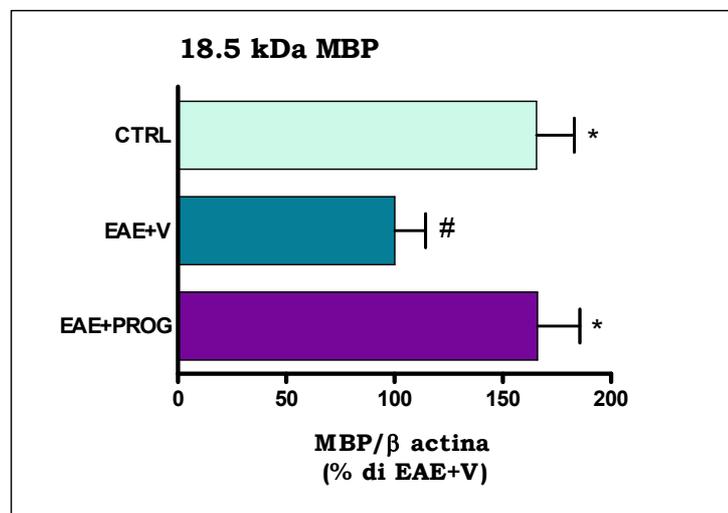


Fig.2.7 Espressione proteica di MBP (18.5 kDa) analizzata tramite Western Blotting a livello del midollo spinale lombare di animali sani (CTRL) e di animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V) o con progesterone (EAE+PROG) e sacrificati al giorno 45pi. I dati sono stati normalizzati rispetto alla β -actina e sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Tukey's. # $P < 0.05$ rispetto ai CTRL, * $P < 0.05$ rispetto agli animali EAE+V.

2.4 Danno assonale

La pompa Na^+, K^+ -ATPasica ripristina il gradiente elettrochimico di Na^+ e K^+ a livello della membrana plasmatica dell'assone dopo il passaggio dell'impulso nervoso e per tale motivo risulta di fondamentale importanza nella regolazione dell'eccitabilità neuronale (Lees et al., 1994).

Come mostrato in precedenza negli animali affetti da EAE al giorno 45pi si osserva una riduzione significativa dell'attività enzimatica della pompa Na^+, K^+ -ATPasica (Vd. Paragrafo 1.4.1). Abbiamo inoltre osservato la comparsa di defosforilazione del neurofilamento-H (NF-H) negli assoni della sostanza bianca midollare (Vd. Paragrafo 1.4.2).

Come precedentemente affermato entrambi i parametri sono indicativi di danno assonale.

Abbiamo quindi voluto indagare se il trattamento con PROG potesse modulare l'attività enzimatica della pompa Na^+, K^+ -ATPasica e potesse ridurre la defosforilazione del NF-H osservata negli assoni del midollo spinale di animali affetti da EAE al giorno 45pi.

2.4.1 Effetto del PROG sull'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica

Come atteso negli animali affetti da EAE al giorno 45pi si osserva una significativa riduzione dell'attività enzimatica della pompa rispetto agli animali di controllo (Fig.2.8; EAE+V).

Il trattamento con PROG risulta efficace nel riportare i livelli dell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica a valori confrontabili con il controllo (CTRL: $\text{media} \pm \text{SEM} = 47.69 \pm 4.557$, $n=8$; EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 30.99 \pm 1.706$, $n=8$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 52,35 \pm 4,526$, $n=8$).

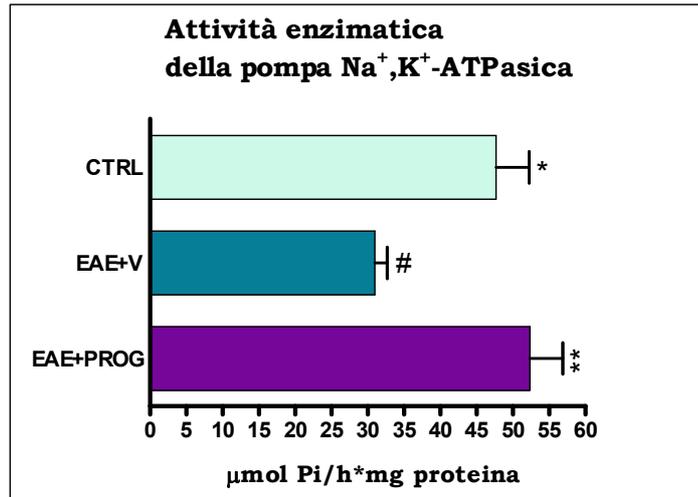


Fig.2.8 Attività enzimatica della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica misurata a livello del midollo spinale lombare di animali sani (CTRL) e di animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V) o con progesterone (EAE+PROG) valutata al giorno 45pi. I valori di attività enzimatica misurati come μmol Pi/h * mg proteina sono espressi come media ± SEM e sono stati analizzati mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Tukey's. # P<0.05 rispetto al CTRL, * P<0.05 e ** P<0.01 rispetto agli animali EAE+V.

2.4.2 Effetto del PROG sulle subunità catalitiche della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica

Al fine di valutare se la modulazione dell'attività enzimatica della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica fosse connessa ad una variazione nell'espressione proteica delle sue subunità catalitiche α (isoforme α1, α2 e α3), abbiamo misurato tale espressione tramite Western Blotting.

Come mostrato in Tabella.2, nei midolli degli animali affetti da EAE (EAE+V), si osserva una tendenza alla riduzione delle tre subunità catalitiche rispetto al controllo, riduzione che tuttavia raggiunge significatività statistica soltanto per l'isoforma α2 (**P<0.01).

Il trattamento con PROG (EAE+PROG) non determina alcuna modificazione significativa nell'espressione proteica delle tre isoforme α se confrontato con i dati ottenuti sui campioni degli animali affetti da EAE trattati con veicolo.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
CTRL	115.8±6.234	142.2±10.16	120.4±9.232
EAE+V	100.0±4.658	100.0±7.417**	100.0±3.871
EAE+PROG	107.2±6.624	115.6±7.349	106.7±8.460

Tabella.2 Espressione proteica delle subunità catalitiche α della pompa Na^+, K^+ -ATPasica (i.e. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) valutata tramite Western Blotting nel midollo spinale lombare di animali sani (CTRL, n=6) e di animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V, n=6) o con progesterone (EAE+PROG, n=6). I dati sono stati normalizzati rispetto alla β -actina e sono stati espressi come media \pm SEM. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Tukey's. **P<0.01 rispetto al CTRL.

2.4.3 Effetto del PROG sulla fosforilazione del neurofilamento-H

Come precedentemente affermato, l'immunomarcatura è stata effettuata utilizzando l'anticorpo SMI32 in grado di riconoscere la forma non fosforilata del neurofilamento-H (NF-H).

Come mostrato in Fig.2.9, le immagini a basso ingrandimento (A, C, E) consentono di osservare neuroni positivi per SMI32 nella sostanza grigia del midollo spinale sia in campioni di controllo (CTRL; A) che negli animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V; C) e con PROG (EAE+PROG; E). Ad alto ingrandimento, invece, è possibile apprezzare la presenza di assoni danneggiati (SMI32⁺) sia negli animali affetti da EAE trattati con veicolo (Fig.2.9 D) che in animali affetti da EAE trattati con PROG (Fig.2.9 F).

Come atteso, nel midollo spinale lombare di animali sani, non è stata evidenziata la presenza di alcun assone SMI32⁺ (Fig.2.9 B).

Tuttavia l'immunoreattività per SMI32 risulta confrontabile tra gli animali affetti da EAE trattati con veicolo e quelli affetti da EAE trattati con PROG (Fig.2.9 D, F).

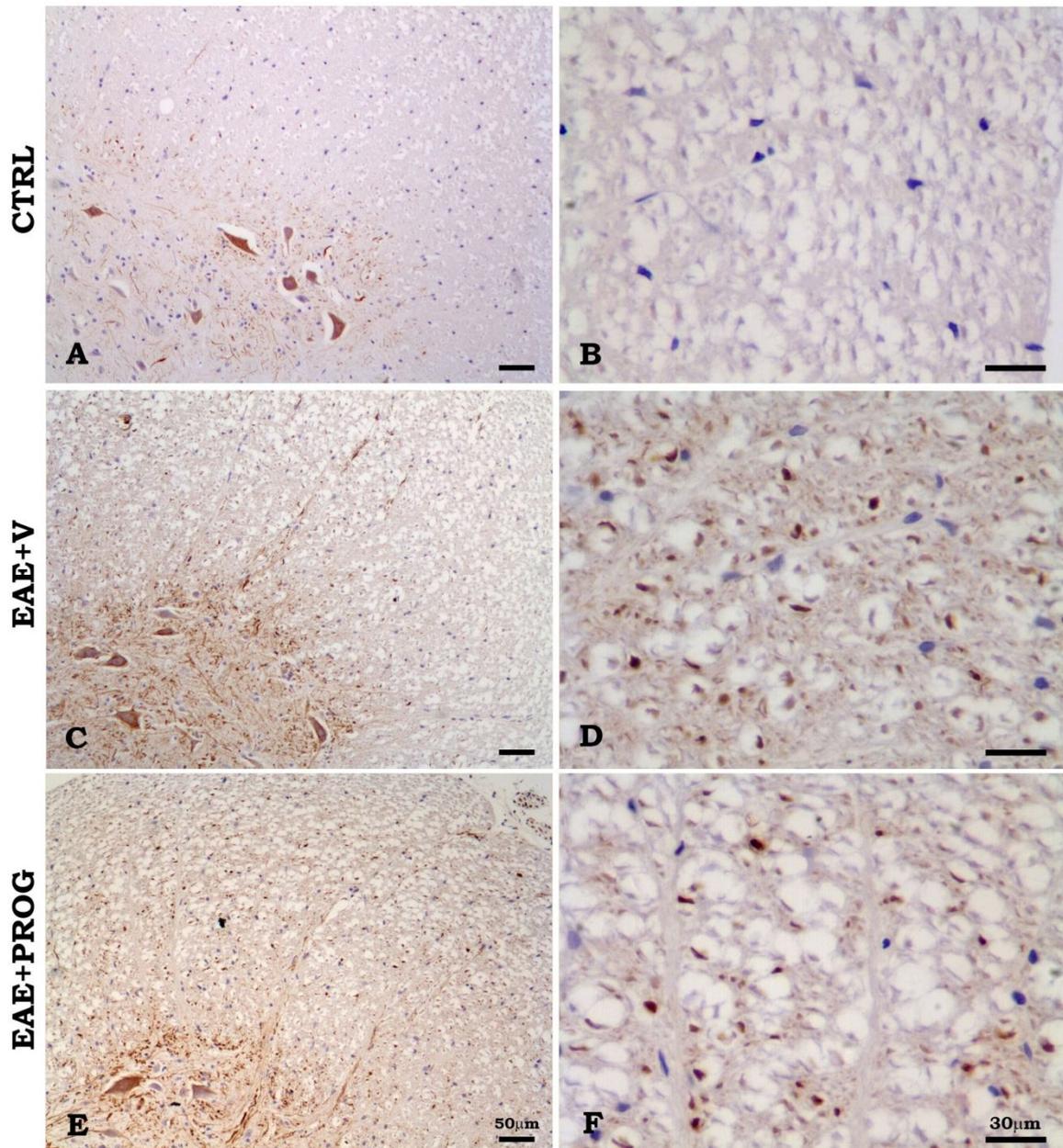


Fig.2.9 Immunolocalizzazione di assoni SMI32⁺ (colorazione marrone) nel midollo spinale lombare di animali sani di controllo (CTRL; A, B) e di animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V; C, D) o con progesterone (EAE+PROG; E, F) valutata al giorno 45pi. Ingrandimento del *funiculus laterale* della sostanza bianca (B, D, F). Barre: 30µm e 50µm.

2.5 Profilo degli steroidi neuroattivi: livello dei metaboliti del PROG

Il PROG può essere metabolizzato a livello del SNC e convertito in metaboliti attivi che possono agire a livello del classico recettore del progesterone (PR), oppure su recettori diversi che mediano meccanismi d'azione differenti (Melcangi et al., 2008).

Abbiamo misurato i livelli di PROG e dei suoi metaboliti diidroprogesterone (DHP), tetraidroprogesterone (THP) e isopregnanolone (i.e. epimero del THP) nel tratto toracico del midollo spinale di animali di controllo e di animali affetti da EAE trattati o meno con PROG.

A conferma di quanto osservato in precedenza (Vd. Tabella.1), negli animali affetti da EAE al giorno 45pi i livelli di PROG si riducono significativamente rispetto al controllo. Il trattamento protratto con PROG è in grado di aumentare i livelli di tale steroide neuroattivo negli animali affetti da EAE ma, come mostrato in Fig.2.10 A, tale aumento non risulta significativo (CTRL: $\text{media} \pm \text{SEM} = 4.103 \pm 1.12$, $n=6$; EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 0.4033 \pm 0.0418$, $n=6$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 1.948 \pm 0.3177$, $n=6$).

Tuttavia nel midollo spinale di animali affetti da EAE trattati con PROG si osserva un significativo aumento nei livelli di DHP (Fig.2.10 B) e di Isopregnanolone (Fig.2.10 D) rispetto agli animali affetti da EAE trattati con veicolo [DHP (EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 48.87 \pm 4.591$, $n=6$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 69.54 \pm 8.365$, $n=6$); Isopregnanolone (EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 1.970 \pm 0.7204$, $n=6$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 15.06 \pm 2.1$, $n=6$)].

Infine, come mostrato in Fig.2.10 C, il trattamento con PROG non determina significative modulazioni nel livello del THP rispetto agli animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V: $\text{media} \pm \text{SEM} = 12.05 \pm 4.217$, $n=6$; EAE+PROG: $\text{media} \pm \text{SEM} = 11.27 \pm 2.386$, $n=6$).

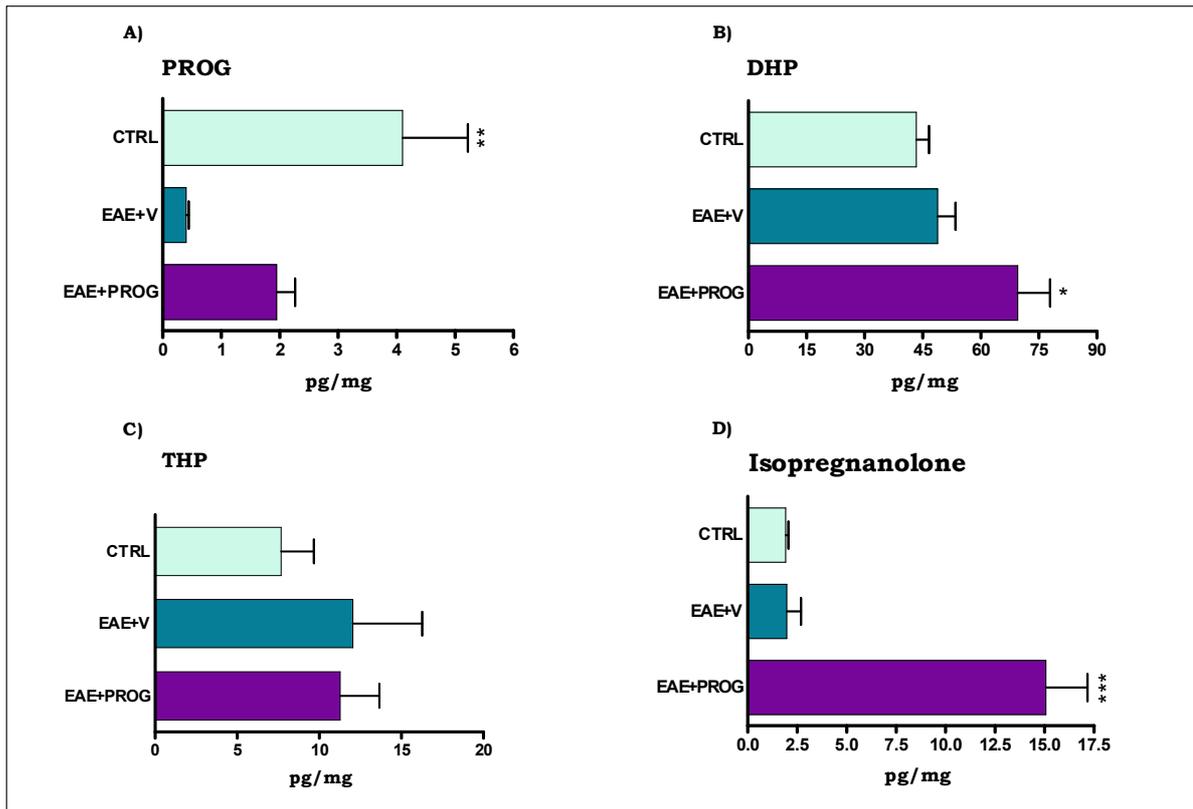


Fig.2.10 Livello di steroidi neuroattivi analizzati nel tratto toracico del midollo spinale in animali sani di controllo (CTRL) e in animali affetti da EAE trattati con veicolo (EAE+V) o con progesterone (EAE+PROG). I livelli di PROG (A), DHP (B), THP (C) e Isopregnanolone (D) sono stati analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS). I dati sono espressi in pg/mg di tessuto (media \pm SEM) e sono stati analizzati mediante ANOVA seguito dal post-hoc test Dunnett's. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ rispetto agli animali EAE+V.

Parte dei risultati presentati sono stati pubblicati in:

Giatti S., Caruso D., Boraso M., Abbiati F., Ballarini E., Calabrese D., Pesaresi M., Rigolio R., Santos-Galindo M., Viviani B., Cavaletti G., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2012. *Neuroprotective Effects of Progesterone in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. *J. Neuroendocrinology*. 24:851-861.

DISCUSSIONE

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia autoimmune del Sistema Nervoso Centrale (SNC) caratterizzata da aree focali d'infiammazione, gliosi, demielinizzazione e perdita assonale (Howell et al., 2010).

La SM è una malattia complessa la cui eziopatogenesi non è stata ancora del tutto chiarita. La forma più diffusa di SM è la Recidivante-Remittente (SM-RR) caratterizzata dall'alternanza tra fasi di remissione e di riacutizzazione sintomatologica. I meccanismi che inducono l'insorgenza della patologia, la remissione spontanea dei sintomi e la comparsa di ricadute non sono del tutto noti nei pazienti affetti da SM-RR così come nel modello animale di SM: l'Encefalomyelite Autoimmune Sperimentale (EAE).

Diverse osservazioni cliniche hanno messo in evidenza la stretta relazione presente tra steroidi sessuali e decorso della SM.

Infatti, situazioni fisiologiche caratterizzate da cambiamenti nei livelli plasmatici degli steroidi sessuali (i.e. ciclo mestruale, gravidanza, menopausa) sono in grado di alterare il decorso clinico della patologia (Pozzili et al., 1999; El-Etr et al., 2005; Vukusic e Confavreux 2006). Inoltre, l'insorgenza della SM stessa può alterare i livelli plasmatici degli steroidi sessuali (Tomassini et al., 2005; Safarinejad et al., 2008).

Gli ormoni steroidei prodotti dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali esercitano la loro azione endocrina sul sistema nervoso il quale, non solo è in grado di metabolizzare tali ormoni in derivati attivi, ma può anche sintetizzare a livello locale neurosteroidi in grado di agire in maniera paracrina o autocrina su neuroni e cellule gliali. Gli ormoni steroidei ed i neurosteroidi fanno parte della famiglia degli steroidi neuroattivi (Melcangi e Panzica, 2006; Melcangi et al., 2008).

Basandosi sulle evidenze cliniche, sono stati condotti due studi al fine di indagare se l'induzione dell'EAE fosse in grado di alterare i livelli di steroidi neuroattivi nel SNC di ratti Dark Agouti (DA) (Caruso et al., 2010; Giatti et al., 2010). Tali studi hanno dimostrato che il profilo degli steroidi neuroattivi viene modificato dall'EAE sia nella sua fase di acuzie clinica (Giatti et al.,

2010) che nella fase più avanzata di cronicizzazione (Caruso et al., 2010) e che tale modulazione risulta differente nelle due fasi di malattia.

Gli studi condotti da Caruso e Giatti hanno posto le basi per il primo lavoro da noi presentato che è nato con lo scopo di valutare se, utilizzando lo stesso ceppo di ratti (i.e.DA) ma inducendo l'EAE mediante un protocollo di immunizzazione differente, fosse possibile osservare una confrontabile modulazione del profilo neurosteroido a livello del midollo spinale.

Inoltre, i due studi sopracitati sono stati ampliati analizzando il profilo neuroinfiammatorio, la demielinizzazione ed il danno assonale in diverse fasi della patologia al fine di comprendere se e come questi differenti parametri si evolvano con il progredire dell'EAE.

Lo scopo ultimo di questa caratterizzazione è stato quello di individuare aspetti potenzialmente rilevanti nella patogenesi dell'EAE e che potessero essere di spunto per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sull'utilizzo di steroidi neuroattivi.

Negli studi condotti da Caruso e Giatti, l'EAE è stata indotta in ratti DA utilizzando un omogenato di midollo spinale di Guinea Pig in adiuvante di Freund addizionato con *Mycobacterium tuberculosis*.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato il medesimo ceppo di ratti ma il protocollo di induzione da noi selezionato ha previsto l'utilizzo di un omogenato di midollo spinale singenico in adiuvante di Freund incompleto.

I motivi che ci hanno indotto a cambiare protocollo di immunizzazione sono stati essenzialmente due. In primo luogo occorre dire che l'EAE è una patologia eterogenea, influenzata dal background genetico dell'animale ma anche dall'antigene selezionato per l'immunizzazione. Inoltre, non esiste un singolo modello di EAE in grado di riflettere tutti gli aspetti di una patologia complessa come la SM quindi utilizzare un modello differente, potrebbe consentire di ottenere informazioni distinte e integrabili con i dati ottenuti in lavori precedenti.

In secondo luogo, il modello da noi selezionato era stato utilizzato in precedenza nel nostro laboratorio (Cavaletti et al., 2004).

Al fine di delineare il profilo neuroimmunologico del nostro modello, abbiamo analizzato la presenza di infiltrati leucocitari, il numero di cellule immunoreattive per MHC-II ed il livello di espressione di diverse citochine nel parenchima del midollo spinale isolato da animali affetti da EAE dopo il picco clinico di malattia (i.e. giorno 14pi: dopo l'induzione) e a stadi avanzati della patologia caratterizzati dall'insorgenza di più ricadute sintomatologiche (i.e. giorno 45pi).

In primo luogo abbiamo osservato una correlazione tra l'outcome neurologico ed il grado di infiltrazione infiammatoria. Infatti, la grave compromissione motoria osservata a picco di malattia (i.e. giorno 14pi) si accompagna alla presenza di infiltrati infiammatori costituiti da linfociti T (CD3⁺) e da cellule macrofagiche (ED1⁺) nel tratto lombare del midollo spinale.

E' possibile affermare che il grado d'infiltrazione infiammatoria osservato al giorno 14pi risulti maggiore rispetto a quanto evidenziato in fase avanzata di EAE (i.e. giorno 45pi). Infatti, soltanto al giorno 14pi, è stato possibile individuare evidenti infiltrati infiammatori immunoreattivi per ED1⁺ nella sostanza grigia del midollo spinale, a indicare il coinvolgimento dei neuroni spinali e quindi un grado di compromissione maggiore rispetto a quanto osservato al giorno 45pi. Inoltre, il ridotto grado d'infiltrazione osservato negli animali affetti da EAE al giorno 45pi si è associato alla manifestazione di segni neurologici più lievi.

L'immunomarcatura per MHC-II ci ha consentito di individuare le cellule in grado di presentare l'antigene quali i macrofagi infiltranti e le cellule della microglia attivata (Tapia-Gonzales et al., 2008).

Nel nostro modello abbiamo osservato che, al giorno 14pi, la maggior parte delle cellule macrofagiche infiltranti (ED1⁺) si localizza in clusters perivascolari ben organizzati mentre, al giorno 45pi, le cellule ED1⁺ sono presenti sporadicamente e sono per lo più localizzate nella sostanza bianca e nella regione sub-meningea del midollo di animali affetti da EAE.

La distribuzione delle cellule MHC-II⁺ diffusa in tutto il parenchima spinale, unitamente alla morfologia stellata mostrata da tali cellule, ci consente quindi di affermare che la maggior parte delle cellule MHC-II⁺ corrisponda alla microglia attivata (Tapia-Gonzales et al., 2008, 2011).

Per tale motivo, l'aumento nel numero di cellule MHC-II⁺ osservato negli animali affetti da EAE sia al giorno 14pi che al giorno 45pi riflette verosimilmente un aumento nell'attivazione microgliale rispetto a quanto osservato negli animali sani di controllo.

Infine, nel midollo spinale isolato da animali affetti da EAE al giorno 14pi, abbiamo osservato un aumento dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β) ed anti-infiammatorie (TGF- β 1).

Questo dato ci consente di ipotizzare che tali citochine svolgano un ruolo nell'induzione dell'EAE. A sostegno della nostra ipotesi Minagar e Alexander hanno dimostrato che la produzione di TNF- α e IL-1 β contribuisce ad indurre le fasi iniziali dell'EAE (Minagar e Alexander, 2003).

L'aumento dell'espressione genica di TGF- β 1, invece, potrebbe essere il risultato dell'attivazione di meccanismi endogeni di protezione. È stato comprovato, infatti, che questa citochina anti-infiammatoria svolga un ruolo inibitorio della risposta immunitaria in modelli di EAE (Jhons e Sriram, 1993).

In conclusione, negli animali affetti da EAE al giorno 14pi, abbiamo osservato un elevato grado d'infiltrazione leucocitaria, una spiccata attivazione della microglia e l'up-regolazione di citochine pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie.

La cronicizzazione della patologia, invece, si associa ad un ridotto grado di infiltrazione infiammatoria, alla down-regolazione delle citochine prese in esame ed alla diminuzione dell'attivazione microgliale.

L'immunoreattività per MHC-II permane comunque maggiore negli animali affetti da EAE al giorno 45pi rispetto agli animali sani di controllo, ad indicare uno stato prolungato dell'attivazione microgliale.

Oltre a delineare il profilo neuroimmunologico del nostro modello, abbiamo indagato l'eventuale comparsa di alterazioni a carico della componente proteica della mielina.

A tal fine abbiamo valutato l'espressione genica di MBP (18.5 kDa e 21.5 kDa), la proteina preposta al mantenimento dell'integrità strutturale e della compattezza della guaina mielinica nel SNC (Schumacher et al., 2012).

Abbiamo osservato una riduzione significativa di entrambe le isoforme al giorno 14pi ma, a stadi avanzati dell'EAE, l'espressione genica di MBP è tornata a livelli confrontabili con il controllo.

Tuttavia ci saremmo attesi che la riduzione dell'espressione genica di MBP non solo fosse mantenuta ma che fosse ancor più significativa al giorno 45pi rispetto a quanto osservato in fase acuta di EAE.

Un'ipotesi per spiegare questa incongruenza potrebbe essere dovuta al fatto che in questo caso non ci sia una corrispondenza diretta tra i livelli di trascritto genico ed i livelli della relativa proteina. Inoltre occorre sottolineare che esistono 4 diverse isoforme di MBP (i.e. 14 kDa, 17 kDa, 18.5 kDa e 21.5 kDa)(Harauz et al., 2004) ma la tecnica da noi utilizzata non consente di discriminare le due isoforme di MBP a basso peso molecolare. Non possiamo quindi escludere che le isoforme di MBP da 14 kDa e da 17 kDa possano risultare ridotte al giorno 45pi. Infine, il fatto che nel nostro modello non si osservi un'alterata espressione genica di MBP a fasi avanzate dell'EAE, potrebbe essere dovuto all'attivazione dei meccanismi di riparo della mielina.

Abbiamo inoltre valutato la possibile presenza di assonopatia che è considerata un evento precoce nella SM e un fattore determinante per l'insorgenza di disabilità neurologica permanente nelle forme progressive della patologia (Trapp e Nave, 2008).

Al fine di indagare l'insorgenza di assonopatia, abbiamo analizzato l'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica e la defosforilazione del neurofilamento-H (NF-H).

La pompa Na^+, K^+ -ATPasica è deputata al ripristino del potenziale di riposo della membrana assonale (Lees e Leong, 1994).

Nel nostro studio abbiamo osservato che negli animali affetti da EAE al giorno 14pi si verifica una riduzione dell'attività enzimatica della pompa Na^+, K^+ -ATPasica, riduzione che risulta ancora più spiccata al giorno 45pi.

La disfunzione della pompa Na^+, K^+ -ATPasica può determinare un accumulo assoplasmatico di Na^+ che renderebbe l'assone cronicamente depolarizzato e ineccitabile. Inoltre, un eccesso di Na^+ assoplasmatico, può comportare l'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti nonché revertire l'attività

dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ne conseguirebbe un accumulo di Ca^{2+} intra-
assonale con attivazione di enzimi degradativi, compromissione del trasporto
assonale e conseguente degenerazione dell'assone (Trapp e Nave, 2008).

Un altro indicatore della comparsa di danno assonale è rappresentato dalla
defosforilazione del neurofilamento-H (NF-H).

La fosforilazione del NF regola il calibro assonale, protegge il NF dalla
proteolisi, regola la velocità del trasporto assonale ed è quindi cruciale per la
corretta conduzione dell'impulso nervoso. Per tale motivo, alterazioni nel
grado di fosforilazione del NF possono determinare cambiamenti strutturali e
funzionali dell'assone predisponendolo alla degenerazione (Perrot et al.,
2008).

L'immunomarcatura è stata effettuata con un anticorpo in grado di
riconoscere la forma non fosforilata del NF-H (i.e. SMI32) ed ha consentito di
evidenziare che l'immunoreattività per SMI32 aumenta con il progredire della
patologia. Tale risultato è stato confermato su tutti i campioni di midollo
spinale analizzati quindi, nonostante non sia stata effettuata un'analisi
quantitativa, riteniamo lecito affermare che la progressione dell'EAE si
associa ad un aumento del danno assonale a livello della porzione lombare
del midollo spinale.

Seppur in quantità scarsa, abbiamo identificato assioni SMI32⁺ anche nel
midollo spinale di animali affetti da EAE al giorno 14pi.

Tale risultato non solo correla con i dati da noi ottenuti sull'attività della
pompa Na^+, K^+ -ATPasica, ma è anche in accordo con quanto osservato in
clinica. Infatti, in pazienti affetti da SM, la defosforilazione del NF-H è stata
identificata a livello di lesioni attive ed il danno assonale è stato correlato
positivamente con il grado di attività infiammatoria ad indicare che la
defosforilazione del NF-H può essere causata da mediatori
dell'infiammazione e rappresenta quindi un evento precoce nella SM (Trapp
et al., 1998).

Abbiamo infine analizzato il profilo degli steroidi neuroattivi a livello della
porzione toracica del midollo spinale allo scopo di valutare se, come

dimostrato dagli studi condotti da Caruso e Giatti, l'insorgenza e la progressione dell'EAE si associno ad una modulazione degli steroidi neuroattivi anche nel nostro modello.

In effetti, i risultati ottenuti tramite le analisi di LC-MS/MS hanno confermato questo dato, anche se abbiamo individuato delle differenze nei livelli degli steroidi neuroattivi rispetto a quanto osservato precedentemente (Caruso et al., 2010; Giatti et al., 2010).

Nel nostro studio al giorno 14pi, abbiamo osservato una generale riduzione nel livello degli steroidi neuroattivi negli animali affetti da EAE rispetto agli animali sani di controllo. In particolare è stata evidenziata la riduzione di PREG, DHP, isopregnanolone, DHEA, DHT e 3β -diolo.

A differenza di quanto ottenuto nel nostro modello, lo studio condotto da Giatti e collaboratori hanno evidenziato anche una riduzione di T, PROG e 3α -diolo in fase acuta di EAE (Giatti et al., 2010). Nel nostro studio, invece, il PROG ed il T hanno mostrato solo una tendenza non significativa alla riduzione ed il 3α -diolo non si è discostato dai valori del controllo. Solo il THP ed il 17β -E sono aumentati nel midollo spinale prelevato al giorno 14pi. Per quanto riguarda la fase di cronicizzazione, al giorno 45pi la maggior parte degli steroidi neuroattivi presi in esame è ritornata ai livelli del controllo a differenza del PREG e del 3β -diolo i cui livelli sono rimasti ridotti. Di particolare interesse è risultata la modulazione del PROG essendo l'unico steroide neuroattivo che, non subendo variazioni al giorno 14pi, si è ridotto in modo significativo solo in fase avanzata di patologia.

Nel modello di EAE utilizzato da Caruso e collaboratori, invece, i livelli di PROG hanno mostrato solo una tendenza alla riduzione durante la fase di cronicizzazione della patologia (Caruso et al., 2010).

Al fine di valutare se la modulazione nel livello degli steroidi neuroattivi nel midollo spinale fosse dovuta ad un cambiamento della loro biosintesi locale, abbiamo valutato l'espressione genica di due enzimi steroidogenici: la 5α -R e la 3α -HSD.

La 5 α -R, enzima in grado di convertire il PROG in DHP e il T in DHT, è risultata ridotta al giorno 14pi in accordo con la riduzione di DHP e DHT osservata in fase acuta di EAE.

L'espressione genica della 3 α -HSD è risultata invece aumenta in accordo con l'incremento nei livelli di THP osservato al giorno 14pi. Infatti, la 3 α -HSD è l'enzima in grado di convertire il DHP in THP.

La differente modulazione degli steroidi neuroattivi osservata in fasi diverse dell'EAE è di complessa interpretazione.

L'aumento del THP e del 17 β -E al giorno 14pi e il loro ritorno ai livelli del controllo al giorno 45pi potrebbe indicare che, in seguito all'insorgenza di EAE, l'organismo attivi meccanismi endogeni di protezione.

Infatti, il 17 β -E è in grado di regolare negativamente l'attivazione della microglia e il conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie (Garcia-Ovejero et al., 2005; Arevalo et al., 2010). Inoltre il THP è in grado di ridurre l'infiltrazione di linfociti e di monociti nel SNC di animali affetti da EAE, può inattivare la microglia e possiede proprietà mielinizzanti (Noorbakhsh et al., 2011).

La riduzione del PROG osservata in fase avanzata dell'EAE suggerisce invece che questo steroide neuroattivo possa avere un ruolo nella cronicizzazione della patologia e che la sua riduzione possa contribuire alla compromissione dei meccanismi riparativi.

Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che il PROG è un noto immunosoppressore in grado di ridurre la gliosi reattiva e di stimolare processi di rimielinizzazione (Garcia-Segura e Melcangi, 2006; Melcangi et al., 2008; Labombarda et al., 2009).

Tali osservazioni ci hanno indotto a studiare il potenziale effetto neuroprotettivo del PROG nel nostro modello di EAE.

Il PROG possiede la proprietà di influenzare eventi neuroinfiammatori in differenti condizioni neurodegenerative (Giatti et al., 2012).

Ad esempio il PROG si è dimostrato in grado di ridurre i livelli di IL-1 β e di TNF- α in un modello di danno celebrale (TBI; Feeser e Loria, 2011) ed è inoltre in grado di inibire l'attivazione della microglia e l'astrogliosi in un

modello di Spinal Cord Injury (i.e. SCI; Garay et al., 2011; Labombarda et al., 2011). Inoltre il PROG promuove la rimielinizzazione stimolando la proliferazione e il differenziamento dei progenitori degli oligodendrociti in oligodendrociti maturi (Ghoumari et al., 2005; Labombarda et al., 2009).

Infine il ruolo neuroprotettivo del PROG è stato documentato in modelli acuti di EAE (Garay et al., 2007, 2009). Il PROG è, infatti, in grado di migliorare il decorso clinico dell'EAE riducendo l'infiltrazione leucocitaria, le placche di demielinizzazione ed il danno assonale (Garay et al., 2007, 2009).

Nonostante le proprietà immunomodulanti e neuroprotettive del PROG siano note, i risultati ottenuti nella seconda parte del nostro studio sono di particolare rilevanza in quanto è stato osservato per la prima volta un effetto protettivo del PROG in un modello cronico di EAE, ossia in una condizione affine alla forma più diffusa di sclerosi multipla: la SM-RR.

In questo secondo studio abbiamo utilizzato lo stesso ceppo di ratti (i.e. DA) ed il medesimo protocollo di immunizzazione descritto in precedenza.

I ratti DA sono stati randomizzati in tre gruppi: un gruppo di animali affetti da EAE e trattati con PROG, un gruppo di animali affetti da EAE e trattati con il veicolo utilizzato per disciogliere il PROG (i.e. olio di sesamo) e un gruppo di animali sani e trattati con veicolo.

Il PROG, così come il suo veicolo, è stato somministrato sottocute alla dose di 1mg/ratto e con una frequenza di giorni alterni a partire dal giorno di induzione dell'EAE e fino a 24 ore prima del sacrificio. Tutti gli animali sono stati sacrificati al giorno 45pi in modo da valutare gli effetti a lungo termine del trattamento con PROG.

Il trattamento con PROG ha determinato un miglioramento sintomatologico negli animali affetti da EAE ed ha ridotto l'indice cumulativo di malattia (i.e. ICM).

Al fine di comprendere il meccanismo d'azione del PROG abbiamo analizzato i parametri che, come dimostrato nello studio precedente, sono modulati dall'EAE.

Al giorno 45pi, nel midollo spinale di animali affetti da EAE, abbiamo osservato la persistenza d'infiltrati macrofagici (ED1⁺) e un aumento nel numero di cellule immunoreattive per MHC-II le quali, per i motivi sopracitati, rappresentano cellule della microglia reattiva. Parallelamente all'attivazione della microglia abbiamo osservato un aumento nell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (i.e. IL-1 β) e anti-infiammatorie (i.e. TGF- β 1) in accordo con quanto precedentemente osservato.

Poiché le citochine possono essere prodotte dalla microglia attivata, dagli astrociti e dai leucociti infiltranti (Tansey et al., 2007; Farina et al., 2007), è ipotizzabile che l'aumento delle citochine da noi osservato sia dovuto, almeno in parte, all'attivazione microgliale. E' verosimile che anche i macrofagi infiltranti contribuiscano all'aumento delle citochine ma, a nostro avviso, tale contributo risulta scarso data la ridotta immunoreattività osservata per ED1 rispetto a quella osservata per MHC-II al giorno 45pi.

La somministrazione di PROG negli animali affetti da EAE si è associata a una ridotta infiltrazione di macrofagi ED1⁺, ad una riduzione nel numero di cellule MHC-II⁺ e alla down-regolazione di IL-1 β e TGF- β 1 a livello del midollo spinale.

Possiamo quindi affermare che, anche nel nostro modello, il PROG possieda proprietà immunomodulanti essendo in grado di ridurre l'infiltrazione macrofagica, di inibire l'attivazione della microglia e la conseguente produzione di citochine pro- e anti-infiammatorie.

Abbiamo inoltre dimostrato che la ridotta attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasica osservata negli animali affetti da EAE al giorno 45pi venga contrastata dalla somministrazione del PROG.

Al fine di valutare se la riduzione dell'attività enzimatica della pompa fosse dovuta ad un'alterata espressione delle sue subunità catalitiche α (i.e. α_1 , α_2 , α_3), ne abbiamo valutato l'espressione proteica a livello del midollo spinale ma i risultati da noi ottenuti hanno evidenziato una sostanziale assenza di variazione nei livelli proteici delle subunità α . Infatti, nel midollo spinale di animali affetti da EAE si è osservata solo la riduzione della subunità α_2 ma

non riteniamo che tale riduzione, pur essendo significativa, sia sufficiente a giustificare la spiccata alterazione dell'attività enzimatica della pompa Na^+, K^+ -ATPasica osservata al giorno 45pi.

La ridotta attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica potrebbe invece essere dovuta ad un deficit nella produzione di ATP conseguente all'alterazione del metabolismo ossidativo mitocondriale. Infatti, a livello delle lesioni croniche di pazienti affetti da SM, sono stati isolati mitocondri funzionalmente compromessi e con una ridotta capacità di sintetizzare molecole di ATP (Dutta et al., 2006).

Alcuni studi sostengono che l'alterazione funzionale dei mitocondri osservata in pazienti affetti da SM possa essere dovuta al rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte di cellule della microglia attivata e di macrofagi.

Nello specifico la microglia attivata e i macrofagi sono in grado di rilasciare radicali liberi dell'ossigeno (i.e. ROS) e ossido nitrico (i.e. NO) che possono contribuire a danneggiare la catena respiratoria mitocondriale.

Nel fluido cerebrospinale e nelle placche attive di pazienti affetti da SM, sono stati individuati rispettivamente elevati livelli di NO e macrofagi/microglia esprimenti iNOS (i.e. enzima di sintesi dell'NO). Inoltre anche nel SNC di animali affetti da EAE è stata osservata un'aumentata espressione di iNOS e di NO (Witherick et al., 2011). Infine è stato dimostrato che l'NO sia in grado di inibire irreversibilmente il complesso IV della catena respiratoria mitocondriale determinando una ridotta produzione di ATP (Knott e Bossy-Wetzel, 2009).

In uno studio condotto su pazienti affetti da SM, l'attività del complesso IV mitocondriale è risultata alterata ed inversamente correlata alla densità di cellule microgliali e macrofagiche presenti nelle aree demielinizzate (Mahad et al., 2009).

Sulla base di queste considerazioni possiamo ipotizzare dunque, che la riduzione dell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasica osservata negli animali affetti da EAE al giorno 45pi, possa essere dovuta ad un deficit energetico mediato dal rilascio di NO da parte della microglia attivata e dei macrofagi infiltranti. La ripresa dell'attività enzimatica conseguente al trattamento con

PROG sarebbe quindi dovuta alla capacità di tale steroide neuroattivo di ridurre l'infiltrazione macrofagica e l'attivazione microgliale.

Come precedentemente accennato, anche la defosforilazione del NF-H può essere dovuta al rilascio di mediatori dell'infiammazione (Trapp et al., 1998).

Nel nostro studio abbiamo osservato che negli animali affetti da EAE al giorno 45pi, la permanenza di macrofagi infiltranti, della microglia attivata e di elevati livelli di IL-1 β correla con un evidente danno assonale identificato dalla presenza di assoni SMI32⁺.

Uno studio condotto su tessuti isolati da pazienti affetti da SM e da un modello murino di EAE ha riportato che la microglia attivata è in grado di alterare la comunicazione tra oligodendrociti e assoni e che tale alterazione correla con l'insorgenza di defosforilazione del NF-H (SMI32⁺; Howell et al., 2010). Nello specifico l'NO rilasciato dalla microglia e dai macrofagi, è in grado di ridurre la fosforilazione del NF e può quindi facilitare la degenerazione assonale rendendo l'assone più suscettibile alla proteolisi (Witherick et al., 2011).

Dunque la defosforilazione del NF-H osservata negli animali affetti da EAE al giorno 45pi potrebbe essere dovuta ad uno stato neuroinfiammatorio prolungato sostenuto dalla permanenza di macrofagi infiltranti e di cellule della microglia attivata.

In questo secondo studio la comparsa di alterazioni nella componente proteica della guaina mielinica è stata valutata utilizzando un approccio differente rispetto a quello del lavoro precedente.

In primo luogo abbiamo effettuato un'analisi immunohistologica per MBP (i.e. isoforma da 21.5 kDa) su sezioni seriali di midollo spinale e successivamente abbiamo valutato l'espressione proteica di tale proteina.

Tramite l'immunomarcatura non è stato possibile evidenziare la comparsa di aree di demielinizzazione negli animali affetti da EAE al giorno 45pi. Inoltre il trattamento con PROG non ha determinato alcuna differenza da un punto di vista istologico.

I dati ottenuti analizzando l'espressione proteica di MBP hanno invece confermato le note capacità mielinizzanti del PROG. Infatti, l'espressione

proteica di MBP (i.e. isoforma da 18.5 kDa) è risultata ridotta in fase avanzata di EAE mentre, negli animali trattati con PROG, si è riportata ai livelli basali del controllo. I livelli proteici dell'isoforma da 21.5 kDa, pur mostrando un andamento analogo a quanto osservato per l'isoforma da 18.5 kDa, non hanno raggiunto la significatività statistica. Tale dato risulta però in accordo con quanto osservato tramite l'analisi immunohistologica.

Come per l'assonopatia, anche la riduzione nei livelli di MBP osservata negli animali affetti da EAE potrebbe essere dovuta al rilascio di ROS e di NO da parte della microglia attivata e dei macrofagi (Merril e Scolding, 1999).

Infatti, gli oligodendrociti sono cellule particolarmente predisposte al danno ossidativo in quanto possiedono bassi livelli di agenti antiossidanti (i.e. Glutathione e SOD) e in quanto la mielina è un target preferenziale per i ROS che, perossidando i lipidi di cui è composta, possono contribuire all'insorgenza di demielinizzazione (Merril e Scolding, 1999; Witherick et al., 2011).

Infine abbiamo analizzato i livelli di PROG e dei suoi metaboliti neuroattivi nel tratto toracico del midollo spinale allo scopo di valutare se l'effetto immunomodulante e neuroprotettivo del PROG fosse dovuto all'azione dello steroide sul suo recettore (i.e. PR) oppure fosse mediato dai suoi metaboliti. Il PROG può infatti essere convertito in DHP che, come il suo precursore, è un ligando del PR (Melcangi et al., 2008) ma il DHP può venire a sua volta metabolizzato in THP e in isopregnanolone che invece legano il recettore GABA_A (Belelli e Lambert., 2005). Quindi la conversione metabolica del PROG a livello del SNC ne influenza fortemente il meccanismo d'azione.

Le analisi di LC-MS/MS hanno mostrato che, nel midollo spinale degli animali affetti da EAE trattati con PROG, quest'ultimo sia convertito in DHP e in isopregnanolone. Se ne deduce quindi che l'effetto del PROG possa essere mediato dal DHP e dalla sua azione sul recettore PR.

A sostegno della nostra ipotesi abbiamo individuato alcuni studi in cui è stato dimostrato l'effetto mielinizzante, immunomodulante e neuroprotettivo del DHP.

Ghoumari e collaboratori hanno dimostrato che le proprietà mielinizzanti del PROG a livello del SNC sono in parte mediate dalla sua conversione in DHP. Infatti, l'inibizione della 5 α -R riduce l'effetto positivo del PROG sull'espressione cerebellare di MBP (Ghoumari et al., 2003).

Il DHP è in grado di ridurre la reattività degli astrociti e di prevenire la perdita dei neuroni ippocampali in un modello animale di eccitotossicità indotta da acido kainico (Ciriza et al., 2004).

Inoltre, in modelli di SCI e di TBI, a seguito del danno si verifica un aumento nella biosintesi locale di PROG e di DHP, suggerendo che la conversione del PROG a DHP in risposta al danno possa essere dovuta all'attivazione di meccanismi riparativi endogeni e possa assumere un ruolo determinante nella mediazione degli effetti neuroprotettivi del PROG (Labombarda et al., 2006; Meffre et al., 2007).

Basandoci sullo stato dell'arte, ci siamo chiesti se l'azione del PROG fosse almeno in parte mediata dal THP.

Infatti il trattamento con THP in un modello di EAE è in grado di ridurre la gravità della sintomatologia neurologica, l'attivazione della microglia così come l'infiltrazione di linfociti e monociti nel SNC (Noorbakhsh et al., 2011). Inoltre il THP è in grado di promuovere il differenziamento degli oligodendrociti e di preservare la mielinizzazione del midollo spinale in animali affetti da EAE (Noorbakhsh et al., 2011).

Tuttavia i dati da noi ottenuti hanno mostrato che, in seguito a trattamento con PROG, i livelli di THP sono rimasti invariati mentre si è osservato un significativo aumento del suo epimero: l'isopregnanolone.

L'aumento dei livelli di isopregnanolone ha rappresentato un'ulteriore conferma che l'effetto del PROG non venga mediato dal THP e dalla sua azione sul recettore GABA_A. L'isopregnanolone è, infatti, in grado di antagonizzare il legame del THP con tale recettore.

In conclusione, nel primo studio abbiamo eseguito un'accurata caratterizzazione del modello di EAE in ratti DA.

Analizzando il profilo neuroinfiammatorio, il danno assonale e il livello di steroidi neuroattivi in diverse fasi della patologia abbiamo dimostrato come questi parametri si evolvano con il progredire dell'EAE.

La differente modulazione nel livello di steroidi neuroattivi è stata indicativa di una loro potenziale rilevanza nella patogenesi dell'EAE. In particolare la significativa riduzione nei livelli di PROG ha suggerito un suo potenziale ruolo nella cronicizzazione della patologia.

Le osservazioni effettuate in questo studio hanno quindi rappresentato la base teorica per il successivo lavoro atto a indagare il ruolo neuroprotettivo del PROG nel nostro modello di EAE.

La somministrazione di PROG è stata in grado di attenuare la gravità sintomatologica della patologia regolando la neuroinfiammazione, aumentando l'espressione proteica di MBP e promuovendo il recupero funzionale degli assoni.

I nostri risultati indicano che il PROG possa agire riducendo l'attivazione della microglia che, mediante il rilascio di specifici mediatori dell'infiammazione, sostiene uno stato neuroinfiammatorio prolungato nel midollo spinale di animali affetti da EAE.

Abbiamo inoltre dimostrato che l'azione del PROG è prevalentemente mediata dal DHP, il suo metabolita neuroattivo che agisce a livello del classico recettore del PROG: il PR.

Si ritiene questo studio di particolare rilevanza dal momento che, per la prima volta, è stato messo in luce l'effetto neuroprotettivo del PROG nell'EAE cronica indotta in ratto che rappresenta un modello affine alla SM-RR, la forma più diffusa di sclerosi multipla.

Per tale motivo i nostri risultati pongono le basi per un possibile approccio terapeutico della SM basato sull'utilizzo di composti di sintesi analoghi del PROG.

BIBLIOGRAFIA

Acs P., Kipp M., Norkute A., Johann S., Clarner T., Braun A., Berente Z., Komoly S., Beyer C., 2009. 17 β -Estradiol and Progesterone Prevent Cuprizone Provoked Demyelination of Corpus Callosum in Male Mice. *Glia*. 57:807-14.

Ahlgren C., Oden A. e Lycke J., 2011. High nationwide prevalence of multiple sclerosis in Sweden. *Mult. Scler.*17:901-8.

Almolda B., Costa M., Montoya M., González B., Castellano B., 2011. Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. *PLoS One*. 6:e27473.

Alonso A., Hernán M.A., 2008. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 71:129-135.

Andersson S., Russell, DW., 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87:3640-3644.

Arevalo M.A., Santos-Galindo M., Bellini M.J., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M., 2010. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta*. 1800:1106–1112.

Azcoitia I., Fernandez-Galaz C., Sierra A., Garcia-Segura L.M., 1999. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J. Neurocytol.* 28:699-710.

Azcoitia I., Leonelli E., Magnaghi V., Veiga S., Garcia-Segura L.M., Melcangi, R.C., 2003. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol. Aging*. 24:853-860.

Barreto G., Veiga S., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M., Garcia-Ovejero D., 2007. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur. J. Neurosci.* 25:3039-3046.

Baulieu, E.E.R.P. a. S.M., 1999. *Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Totowa.

Bebo B.F., Jr Fyfe-Johnson A., Adlard K., Beam A.G., Vandembark A.A., Offner H., 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J. Immunol.* 166:2080-2089.

Beeton C., Garcia A., Chandy K.G., 2007. Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Vis. Exp.* 10:3791-224.

- Belelli D., Lambert J.J., 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:565–575.
- Benmessahel Y., Troadec J.D., Cadepond F., Guennoun R., Hales D.B., Schumacher M., Groyer G., 2004. Downregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by cyclic AMP in cultured Schwann cells. *Glia.* 45:213-228.
- Ben-Nun A., Wekerle H., Cohen I.R., 1981. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 11:195-9.
- Bergamaschi R., 2007. Prognostic factors in multiple sclerosis. *Int. Rev. Neurobiol.* 79:423-447.
- Bianchi R., Buyukakilli B., Brines M., Savino C., Cavaletti G., Oggioni N., Lauria G., Borgna M., Lombardi R., Cimen B., Comelekoglu U., Kanik A., Tataroglu C., Cerami A., Ghezzi P., 2004. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:823–828.
- Bourque M., Dluzen D.E., Di Paolo T., 2009. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol.* 30:142-57.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254.
- Carroll J.C., Rosario E.R., Villamagna A., Pike C.J., 2010. Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTransgenic-Alzheimer's disease mice. *Endocrinology.* 151:2713-22.
- Caruso D., D'Intino G., Giatti S., Maschi O., Pesaresi M., Calabrese D., Garcia-Segura L.M., Calza L., Melcangi R.C., 2010. Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 114:921-32.
- Caruso D., Scurati S., Maschi O., De Angelis L., Roglio I., Giatti S., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2008a. Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: Effect of diabetes. *Neurochem. Int.* 52:560-8.
- Caruso D., Scurati S., Roglio I., Nobbio L., Schenone A., Melcangi R.C., 2008b. Neuroactive steroid levels in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *J. Mol. Neurosci.* 34:249-253.
- Cavaletti G., Cavalletti E., Crippa L., Di Luccio E., Oggioni N., Mazzanti B., Biagioli T., Sala F., Sala V., Frigo M., Rota S., Tagliabue E., Stanzani L., Galbiati S., Rigolio R., Zoia C., Tredici G., Perseghin P., Dessi M., Riccio P., Lolli F., 2004. Pixantrone

(BBR2778) reduces the severity of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 151:55–65.

Chang A., Tourtellotte W.W., Rudick R., Trapp B.D., 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 346:165–173.

Cheng J., Alkayed N.J., Hurn P.D., 2007. Deleterious effects of dihydrotestosterone on cerebral ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27:1553–1562.

Chiaravalloti N.D., DeLuca J., 2008. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7:1139–1151.

Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156–159.

Chun J., Hartung H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33:91–101

Ciriza I., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M., 2004. Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo. *J. Neuroendocrinol.* 16:58–63.

Cohen J.A., Barkhof F., Comi G., Hartung H.P., Khatri B.O., Montalban X., Pelletier J., Capra R., Gallo P., Izquierdo G., Tiel-Wilck K., de Vera A., Jin J., Stites T., Wu S., Aradhye S., Kappos L., TRANSFORMS Study Group, 2010. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362:402–415.

Comi G., Filippi M., Barkhof F., Durelli L., Edan G., Fernández O., Hartung H., Seeldrayers P., Sørensen P.S., Rovaris M., Martinelli V., Hommes O.R., 2001. Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet.* 357:1576–82.

Compagnone N.A., Mellon S.H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.* 21:1–56.

Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L., Mellon S.H., 1995. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology.* 136:2689–2696.

Compston A., Coles A., 2002. Multiple sclerosis. *Lancet.* 359:1221–31.

Compston A., 1999. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos. Trans. R. SocLond. B. BiolSci.* 354:1623–34.

Cooke B., Hegstrom C.D., Villeneuve L.S., Breedlove S.M., 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 19:323–362.

- Corpechot C., Robel P., Axelson M., Sjovall J., Baulieu E.E., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:4704-4707.
- Corpechot C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjovall J., Vihko R., Baulieu E. E. e Robel P., 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain. Res.* 270:119-125.
- Czlonkowska A., Ciesielska A., Gromadzka G., Kurkowska-Jastrzebska I., 2006. Gender differences in neurological disease: role of estrogens and cytokines. *Endocrine.* 29:243-256.
- Dalal M., Kim S., Voskuhl R.R., 1997. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J. Immunol.* 159:3-6.
- D'Astous M., Morissette M., Tanguay B., Callier S., Di Paolo, T., 2003. Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse.* 47:10-14.
- Datla K.P., Murray H.E., Pillai A.V., Gillies G.E., Dexter D.T., 2003. Differences in dopaminergic neuroprotective effects of estrogen during estrous cycle. *Neuroreport.* 14:47-50.
- Denic A., Johanson A.J., Bieber A.J., Warrington A.E., Rodriguez M., Pirko I., 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology.* 18:21-29.
- Devonshire V., Havrdova E., Radue E.W., O'Connor P., Zhang-Auberson L., Agoropoulou C., Häring D.A., Francis G., Kappos L., FREEDOMS study group, 2012. Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomised, placebo-controlled FREEDOMS study. *Lancet. Neurol.* 11:420-428.
- Dubrovsky B., 2006. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84:644-655.
- Duddy M., Niino M., Adatia F., Hebert S., Freedman M., Atkins H., Kim H.J., Bar-Or A., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 178:6092-6099.
- Dutta R., McDonough J., Yin X., Peterson J., Chang A., Torres T., Gudz T., Macklin W.B., Lewis D.A., Fox R.J., Rudick R., Mirnics K., Trapp B.D., 2006. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 59:478-89.
- El-Etr M., Vukusic S., Gignoux L., Durand-Dubief F., Achiti I., Baulieu E.E., Confavreux C., 2005. Steroid hormones in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 233:49-54.

Farina C., Aloisi F., Meinl E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-145.

Feeser V.R., Loria R.M., 2011. Modulation of traumatic brain injury using progesterone and the role of glial cells on its neuroprotective actions. *J. Neuroimmunol.* 237:4-12.

Ferrarese C., Appollonio I., Cavaletti G., Sganzerla E.P., Cortelli P., Federico A., Marciani M.G., 2011. *Malattie del sistema nervoso-Core Curriculum.* McGraw Hill.

Fragkoudis R., Tamberg N, Siu R., Kiiver K., Kohl A., Merits A., Fazakerley J.K., 2009. Neurons and oligodendrocytes in the mouse brain differ in their ability to replicate Semliki Forest virus. *J. Neurovirol.* 15:57-70.

Galea L.A., 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res. Rev.* 57:332-341.

Gandhi R., Laroni A., Weiner H.L., 2010. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 221:7-14.

Garay L., Deniselle M.C., Lima A., Roig P., De Nicola A.F., 2007. Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 107:228-237.

Garay L., Deniselle M.C., Meyer M., Costa J.J., Lima A., Roig P., De nicola, A.F., 2009. Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1283:177-185.

Garay L., Tungler V., Deniselle M.C., Lima A., Roig P., De Nicola A.F., 2011 Progesterone attenuates demyelination and microglial reaction in the lyssolecithin-injured spinal cord. *Neuroscience.* 192:588-597.

Garay L.I., Gonzalez Deniselle M.C., Brocca M.E., Lima A., Roig P., DeNicola A.F., 2012. Progesterone Down-Regulates Spinal Cord Inflammatory Mediators And Increases Myelination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 226:40-50.

Garcia-Estrada J., Del Rio J.A., Luquin S., Soriano E., Garcia-Segura L.M., 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain. Res.* 628:271-278.

Garcia-Ovejero D., Azcoitia I., Doncarlos L.L., Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., 2005. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48:273-286.

Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2006. Steroids and glial cell function. *Glia.* 54:485-498.

Ghoumari A.M, Baulieu E.E., Schumacher M., 2005. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience.* 135:47-58.

Ghoumari A.M., Ibanez C., El-Etr M., Leclerc P., Eychenne B., O'Malley B.W., Baulieu, E.E., Schumacher M., 2003. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* 86:848–859.

Giatti S., Boraso M., Melcangi R.C. Viviani B., 2012. Neuroactive steroids, their metabolites and neuroinflammation. *J. Mol. Endocrinol.* 49:R125-34.

Giatti S., D'Intino G., Maschi O., Pesaresi M., Garcia-Segura L.M., Calza L., Caruso D., Melcangi R.C., 2010. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels *Neurochem. Int.* 56:118-27.

Gibson C.L., Constantin D., Prior M.J., Bath P.M., Murphy S.P., 2005. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* 193:522-30.

Gibson C.L., Gray L.J., Bath P.M., Murphy S.P., 2008. Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain.* 131:318-328.

Gold S.M., Voskuhl R.R., 2009. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog. Brain. Res.* 175:239-51.

Goodin D.S., Frohman E.M., Garmany G.P. Jr, Halper J., Likosky W.H., Lublin F.D., Silberberg D.H., Stuart W.H., van den Noort S., Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines, 2002. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology.* 59:169-178.

Gourraud P.A., Harbo H.F., Hauser S.L., Baranzini S.E., 2012. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol. Rev.* 248:87-103

Guennoun R., Benmessahel Y., Delespierre B., Guezou M., Rajkowski K. M., Baulieu E.E., Schumacher M., 2001. Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90:75-82.

Hanisch U.K., Kettenmann H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10:1387-1394.

Harauz G., Ishiyama N., Hill C.M., Bates I.R., Libich D.S., Farès C., 2004. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron.* 35:503-42.

Hartung H.P., Gonsette R., König N., Kwiecinski H., Guseo A., Morrissey S.P., Krapf H., Zwingers T., Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS), 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* 360:2018-2025.

- Hatton W.J., von Bartheld C.S., 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J. Comp. Neurol.* 409:169-186.
- Hemmer B., Archelos J.J., Hartung H.P., 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:291-301.
- Hoffman G.E., Le W.W., Murphy A.Z., Koski C.L., 2001. Divergent Effects of Ovarian Steroids on Neuronal Survival during Experimental Allergic Encephalitis in Lewis Rats. *Exp. Neurol.* 171:272-84.
- Hosie A.M., Wilkins M.E., da Silva H.M., Smart T.G., 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature.* 444:486-489.
- Howell O.W., Rundle J.L., Garg A., Komada M., Brophy P.J., Reynolds R., 2010. Activated Microglia Mediate Axoglial Disruption That Contributes to Axonal Injury in Multiple Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69:1017-1033.
- Hvas J., McLean C., Justesen J., Kannourakis G., Steinman L., Oksenberg J.R., Bernard C.C., 1997. Perivascular T cells express the pro-inflammatory chemokine RANTES mRNA in multiple sclerosis lesions. *Scand. J. Immunol.* 46:195-203.
- Ishigami T., White C.A. e Pender M.P., 1998. Soluble antigen therapy induces apoptosis of autoreactive T cells preferentially in the target organ rather than in the peripheral lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 28:1626-1635.
- Ishrat T., Sayeed I., Atif F., Hua F., Stein D.G.C.P., 2010. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp. Neurol.* 226:183-190.
- Ito A., Bebo B.F. Jr, Matejuk A., Zamora A., Silverman M., Fyfe-Johnson A., Offner H., 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J. Immunol.* 167:542-552.
- 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. CHAMPS Study Group. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343:898-904.
- Jiang C., Cui K., Wang J., He Y., 2011. Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *Int. Immunopharmacol.* 11:1925-1931.
- Jiang Y., Salafranca M.N., Adhikari S., Xia Y., Feng L., Sonntag M.K., deFiebre C.M., Pennell N.A., Streit W.J., Harrison J.K., 1998. Chemokine receptor expression

in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 86:1-12.

Johns L.D., Sriram S., 1993. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. *J. Neuroimmunol.* 47:1-7.

Johnson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A., Ford C.C., Goldstein J., Lisak R.P., Myers L.W., Panitch H.S., Rose J.W., Schiffer R.B., Vollmer T., Weiner L.P., Wolinsky J.S., Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group., 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *Neurology.* 45:1268-1276.

Johnson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A., Ford C.C., Goldstein J., Lisak R.P., Myers L.W., Panitch H.S., Rose J.W., Schiffer R.B., Vollmer T., Weiner L.P., Wolinsky J.S., Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. 1998. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology.* 50:701-708.

Kabat E.A., Wolf A., Bezer A.E., 1947. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.* 85:117-1130.

Kahana E., Leibowitz U., Alter M., 1973. Brainstem and cranial nerve involvement in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 49:269-279.

Kipp M., Clarner T., Dang J., Copray S., Beyer C., 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Neuropathol.* 118:723-736.

Kipp M., van der Star B., Vogel D.Y.S., Puentes F., van der Valk P., Baker D., Amor S., 2012. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 1:15-28.

Knott A.B., Bossy-Wetzel E., 2009. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid. Redox. Signal.* 11:541-54.

Koenig H.L., Schumacher M., Ferzaz B., Thi A.N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E.E., 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science.* 268:1500-1503.

Labombarda F., Gonzalez S., Lima A., Roig P., Guennoun R., Schumacher M., De Nicola A.F., 2011. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 231:135-146.

Labombarda F., González S.L., Lima A., Roig P., Guennoun R., Schumacher M., de Nicola A.F., 2009. Effects of Progesterone on Oligodendrocyte Progenitors,

Oligodendrocyte Transcription Factors, and Myelin Proteins Following Spinal Cord Injury *Glia*. 57:884-97.

Labombarda F., Pianos A., Liere P., Eychenne B., Gonzalez S., Cambourg A., De Nicola A.F., Schumacher M., Guennoun R., 2006. Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology*. 147:1847-1859.

Lavaque E., Sierra A., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M., 2006. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience*. 138:741-747.

Le Goascogne C., Robel P., Gouezou M., Sananes N., Baulieu E.E., Waterman, M., 1987. Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 237:1212-1215.

Lees G.J., Leong W., 1994. Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium-potassium ATPase. *Brain Res*. 649:225-33.

Leonelli E., Bianchi R., Cavaletti G., Caruso D., Crippa D., Garcia-Segura L.M., Lauria G., Magnaghi V., Roglio I., Melcangi R.C., 2007. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience*. 144:1293-1304.

Lephart E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 22:1-26.

Li D.K., Paty D.W., 1999. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* 46:197-206.

Loeb C., Favale.E., 2003. *Neurologia di Fazio-Loeb*. SEU-Roma.

Loma I., Heyman R., 2011. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol.* 9:409-416.

Lorentzen J.C., Issazadeh S., Storch M., Mustafa M.I., Lassman H., Linington C., Klareskog L., Olsson T., 1995. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngenic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J. Neuroimmunol.* 63:193-205.

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

Luchetti S., Huitinga I., Swaab DF., 2011. Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. *Neuroscience*. 191:6-21.

- Lukic M.L., Mensah-Brown E., Galadari S., Shahin A., 2001. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Dev. Immunol.* 8:193-200.
- Maccio D.R., Calfa G., Roth G.A., 2005. Oral testosterone in male rats and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation.* 12:246-254.
- Magnaghi V., Ballabio M., Gonzalez L.C., Leonelli E., Motta M., Melcangi R.C., 2004. The synthesis of glycoprotein Po and peripheral myelin protein 22 in sciatic nerve of male rats is modulated by testosterone metabolites. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 126:67-73.
- Magnaghi V., Ballabio M., Roglio I., Melcangi R.C., 2007. Progesterone derivatives increase expression of Krox-20 and Sox-10 in rat Schwann cells. *J. Mol. Neurosci.* 31:149-157.
- Magnaghi V., Cavarretta I., Zucchi I., Susani L., Rupprecht R., Hermann B., Martini L., Melcangi R.C., 1999. P0 gene expression is modulated by androgens in the sciatic nerve of adult male rats. *Mol. Brain. Res.* 70:36-44.
- Mahad D.J., Ziabreva I., Campbell G., Lax N., White K., Hanson P.S., Lassmann H., Turnbull D.M., 2009. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain.* 132:1161-1174.
- Majewska M.D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38:379-395.
- Marx C.E., Trost W.T., Shampine L.J., Stevens R.D., Hulette C.M., Steffens D.C., Ervin J.F., Butterfield M.I., Blazer D.G., Massing M.W., Lieberman J.A., 2006. The Neurosteroid Allopregnanolone Is Reduced in Prefrontal Cortex in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry.* 60:1287-1294.
- Matejuk A., Adlard K., Zamora A., Silverman M., Vandenbark A.A., Offner H., 2001. 17beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 65:529-542.
- Matejuk A., Hopke C., Vandenbark A.A., Hurn P.D., Offner H., 2005. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J. Immunol.* 174:2387-2395.
- Maurice T., Gregoire C., Espallergues J., 2006. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84:581-597.

Maurice T., Phan V.L., Urani A., Kamei H., Noda Y., Nabeshima T., 1999. Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities. *Jpn. J. Pharmacol.* 81: 125-155.

McCullough L.D., Blizzard K., Simpson E.R., Oz O.K., Hurn P.D., 2003. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J. Neurosci.* 23:8701-8705.

McFarland H.F., Martin R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol. Rev.* 8:913-919.

McFarlin D.E., McFarland H.F., 1982. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 307:1183-1188.

Meffre D., Pianos A., Liere P., Eychenne B., Cambourg A., Schumacher M., Stein D.G., Guennoun R., 2007. Steroid Profiling in Brain and Plasma of Male and Pseudopregnant Female Rats after Traumatic Brain Injury: Analysis by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Endocrinology.* 148:2505-2517.

Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., 2006a. Therapeutic approaches to peripheral neuropathy based on neuroactive steroids. *Expert. Rev. Neurother.* 6:1121-1125.

Melcangi R.C., Panzica G.C., 2006b. Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience.* 138:733-739.

Melcangi R.C., Azcoitia I., Ballabio M., Cavarretta, I., Gonzalez L.C., Leonelli E., Magnaghi V., Veiga S., Garcia-Segura L.M., 2003a. Neuroactive steroids influence peripheral myelination: a promising opportunity for preventing or treating age-dependent dysfunctions of peripheral nerves. *Prog. Neurobiol.* 71:57-66.

Melcangi R.C., Caruso D., Levandis G., Abbiati F., Armentero M.T., Blandini F., 2012. Modifications of Neuroactive Steroid Levels in an Experimental Model of Nigrostriatal Degeneration: Potential Relevance to the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *J. Mol. Neurosci.* 46:177-183.

Melcangi R.C., Cavarretta I.T., Ballabio M., Leonelli E., Schenone A., Azcoitia I., Miguel Garcia-Segura L., Magnaghi V., 2005. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48:328-338.

Melcangi R.C., Celotti F., Ballabio M., Poletti A., Martini L., 1990. Testosterone metabolism in peripheral nerves: presence of the 5 alpha-reductase-3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase enzymatic system in the sciatic nerve of adult and aged rats. *J. Steroid. Biochem.* 35:145-148.

Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., Mensah-Nyagan A.G., 2008. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:777-797.

- Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., 2010. Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: In search for innovative tools for neuroprotection. *Horm. Behav.* 57:2-11.
- Melcangi R.C., Leonelli E., Magnaghi V., Gherardi G., Nobbio L., Schenone A., 2003b. Mifepristone (RU 38486) influences expression of glycoprotein Po and morphological parameters at the level of rat sciatic nerve: in vivo observations. *Exp. Neurol.* 184:930-938.
- Melcangi R.C., Magnaghi V., Cavarretta I., Martini L., Piva F., 1998. Age-induced decrease of glycoprotein Po and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience.* 85:569-578.
- Melcangi R.C., Magnaghi V., Martini L., 2000b. Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog. Neurobiol.* 60:291-308.
- Melcangi R.C., Magnaghi V., Galbiati M., Martini L., 2001a. Glial cells: a target for steroid hormones. *Prog. Brain. Res.* 132:31-40.
- Melcangi R.C., Magnaghi V., Galbiati M., Martini L., 2001b. Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 46:145-176.
- Melcangi R.C., Magnaghi V., Galbiati M., Ghelarducci B., Sebastiani L., Martini L., 2000. The action of steroid hormones on peripheral myelin proteins: a possible new tool for the rebuilding of myelin? *J. Neurocytol.* 29:327-339.
- Melcangi R.C., Panzica G., Garcia-Segura L.M., 2011. Neuroactive steroids: focus on the human brain. *Neurosci.* 191:1-5.
- Mellon S.H., Griffin L.D., Compagnone N.A., 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37:3-12.
- Mensah-Brown E.P., Shahin A., Shamisi M.A., Lukic M.L., 2011. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J. Neuroimmunol.* 232:68-74.
- Mercier G., Turque N., Schumacher M., 2001. Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 97:137-148.
- Merrill J.E., Scolding N.J., 1999. Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25:435-458.
- Miller D.H., Khan O.A., Sheremata W.A., Blumhardt L.D., Rice G.P., Libonati M.A., Willmer-Hulme A.J., Dalton C.M., Miszkiel K.A., O'Connor P.W., International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group, 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 348:15-23.

- Miller D.H., Leary S.M., 2007. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 6:903-912.
- Minagar A., Alexander J.S., 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 9:540-549.
- Mix E., Meyer-Rienecker H., Hartung H.P., Zettl U.K., 2010. Animal model of multiple sclerosis-potentials and limitations. *Prog. Neurobiol.* 92:386-404.
- Monnet F.P., Mahe V., Robel P., Baulieu E.E., 1995. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:3774-3778.
- Morissette M., Sweidi S.A., Callier S., Di Paolo T., 2008. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol. Cell Endocrinol.* 290:60-9.
- Morris J.A., Jordan C.L., Breedlove S.M., 2004. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat. Neurosci.* 7:1034-1039.
- Nave K.A., Trapp B.D., 2008. Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu. Rev. Neurosci.* 31:535-561.
- Navikas V., Link H., 1996. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 45:322-333.
- Nixon R.A., Sihag R.K., 1991. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends. Neurosci.* 14:501-6.
- Noorbakhsh F., Ellestad K.K., Maingat F., Warren K.G., Han M.H., Steinman L., Baker G.B., Power C., 2011. Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis. *Brain.* 134:2703-2721.
- Nylander A., Hafler D.A., 2012. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 122:1180-1188.
- O'Connor C.A., Cernak I., Johnson F., Vink R., 2007. Effects of progesterone on neurologic and morphologic outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 205:145-53.
- Oksenberg J.R., Barcellos L.F., Cree B.A.C., Baranzini S.E., Bugawan T.L., Khan O., Lincoln R.R., Swerdlin A., Mignot E., Lin L., Goodin D., Erlich H.A., Schmidt S., Thomson G., Reich D.E., PericakVance M.A., Haines J.L., Hauser S.L., 2004. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 74:160-167.
- Palaszynski K.M., Loo K.K., Ashouri J.F., Liu H.-B., Voskuhl R.R., 2004. Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 146:144-152.

- Pan Y., Zhang H., Acharya A.B., Patrick P.H., Oliver D., Morley J.E., 2005. Effect of testosterone on functional recovery in a castrate male rat stroke model. *Brain. Res.* 1043:195-204.
- Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapere J.J., Lindemann P., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M., 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:402-409.
- Patte-Mensah C., Penning T.M., Mensah-Nyagan, A.G., 2004. Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 477:286-299.
- Paul S.M., Purdy R.H., 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6:2311-2322.
- Perrot R., Berges R., Bocquet A., Eyer J., 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 38:27-65.
- Pesaresi M., Giatti S., Cavaletti G., Abbiati F., Calabrese D., Bianchi R., Caruso D., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2011a. Sex differences in the manifestation of peripheral diabetic neuropathy in gonadectomized rats: a correlation with the levels of neuroactive steroids in the sciatic nerve. *Exp. Neurol.* 228:215-21.
- Pesaresi M., Giatti S., Cavaletti G., Abbiati F., Calabrese D., Lombardi R., Bianchi R., Lauria G., Caruso D., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C., 2011b. Sex-dimorphic effects of dehydroepiandrosterone in diabetic neuropathy. *Neuroscience.* 199:401-9.
- Polman C.H., O'Connor P.W., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Miller D.H., Phillips J.T., Lublin F.D., Giovannoni G., Wajgt A., Toal M., Lynn F., Panzara M.A., Sandrock A.W., AFFIRM Investigators, 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354: 899-910.
- Pozzili C., Falaschi P., Mainero C., Martocchia A., D'Urso R., Proietti A., et al., 1999. MRI in multiple sclerosis during the menstrual cycle: relationship with sex hormone patterns. *Neurology.* 53:622-4.
- Prat A., Antel J., 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 18-225-230.
- PRISMS Study Group, 1998. Randomized double-blind placebo controlled study of interferon β -1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet.* 352:1498-1504.
- Raine C.D., McFarland H.F., Hohlfeld R., 2008. *Multiple Sclerosis: a comprehensive text.* Saunders Elsevier Editor.
- Rigolio R., Biffi A., Oggioni N., Cavaletti G., 2008. Actively induced EAE in Lewis rats: characterization of spleen and spinal cord infiltrating lymphocytes by flow cytometry during the course of the disease. *J. Neuroimmunol.* 199:67-74.

Rivers T.M., Sprunt D.H., Berry G.P., 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58:39-53.

Rock R.B., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., Peterson P.K., 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:942-964.

Rodriguez-Waitkus P.M., Lafollette A.J., Ng B.K., Zhu T.S., Conrad H.E., Glaser M., 2003. Steroid hormone signaling between Schwann cells and neurons regulates the rate of myelin synthesis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1007:340-348.

Roglio I., Bianchi R., Camozzi F., Carozzi V., Cervellini I., Crippa D., Lauria G., Cavaletti G., Melcangi R.C., 2009. Docetaxel-induced peripheral neuropathy: protective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 14:36-44.

Roglio I., Bianchi R., Gotti S., Scurati S., Giatti S., Pesaresi M., Caruso D., Panzica G.C., Melcangi R.C., 2008. Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience.* 155:673-685.

Roselli C.E., Horton L.E., Resko J.A., 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology.* 117:2471-2477.

Rovaris M., Confavreux C., Furlan R., Kappos L., Comi G., Filippi M., 2006. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol.* 5:343-354.

Rudick R.A., Goodkin D.E., Jacobs L.D., Cookfair D.L., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M., Fischer J.S., Granger C.V., Simon J.H., Alam J.J., Simonian N.A., Champion M.K., Bartoszak D.M., Bourdette D.N., Braiman J., Brownscheidle C.M., Coats M.E., Cohan S.L., Dougherty D.S., Kinkel R.P., Mass M.K., Munschauer F.E., Priore R.L., Pullicino P.M., Scherokman B.J., Weinstock-Guttman B., Whitham R.H., 2001. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. 1997. *Neurology.* 57:S25-30.

Sadovnick A.D., Armstrong H., Rice G.P., Bulman D., Hashimoto L., Paty D.W., Hashimoto S.A., Warren S., Hader W., Murray T.J., et al., 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol.* 33:281-285.

Safarinejad M.R., 2008. Evaluation of endocrine profile, hypothalamic-pituitary-testis axis and semen quality in multiple sclerosis. *J. Neuroendocrinol.* 20:1368-1375.

Scharschmidt B.F., Keefe E.B., Blankenship N.M., Ockner R.K., 1979. Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and Na,K-ATPase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 93:790-9.

- Schilinger B.A., Remage-Healey L., 2011. Neurosteroidogenesis: insights from studies of songbirds. *J. Neuroendocrinol.* 24:16-21.
- Schirmer L., Antel J.P., Brück W., Stadelmann C., 2011. Axonal Loss and Neurofilament Phosphorylation Changes Accompany Lesion Development and Clinical Progression in Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* 21:428-40.
- Schrempf W., Ziemssen T., 2007. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 6:469-75.
- Schumacher M., Guennoun R., Robert F., Carelli C., Gago N., Ghomari A., Gonzalez Deniselle M.C., Gonzalez S.L., Ibanez C., Labombarda F., Coirini H., Baulieu E.E., De Nicola A.F., 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF. Res.* 14 Suppl A, S18-33.
- Schumacher M., Hussain R., Gago N., Oudinet J.P., Mattern C., Ghomari A.M., 2012. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci.* 6:1-22.
- Schwartz M., Butovsky O., Bruck W., Hanisch U.K., 2006. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends. Neurosci.* 29:68-74.
- Sellebjerg F., Barnes D., Filippini G., Midgard R., Montalban X., Rieckmann P., Selmaj K., Visser L.H., Sørensen P.S., 2005. EFNS Task Force on Treatment of Multiple Sclerosis Relapses. EFNS guideline on treatment of multiple sclerosis relapses: report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur. J. Neurol.* 12:939-946.
- Shindler K.S., Kenyon L.C., Dutt M., Hingley S.T., Das Sarma J., 2008. Experimental optic neuritis induced by a demyelinating strain of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 82:8882-8886.
- Sicotte N.L., Giesser B.S., Tandon V., Klutch R., Steiner B., Drain A.E., Shattuck D.W., Hull L., Wang H.J., Elashoff R.M., Swerdloff R.S., Voskuhl R.R., 2007. Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study. *Arch. Neurol.* 64:683-688.
- Sicotte N.L., Liva S.M., Klutch R., Pfeiffer P., Bouvier S., Odesa S., Wu T.C., Voskuhl R.R., 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann. Neurol.* 52:421-8.
- Sierra A., Lavaque E., Perez-Martin M., Azcoitia I., Hales D.B., Garcia-Segura, L.M., 2003. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur. J. Neurosci.* 18:1458-1467.
- Simon J.H., 1996. Magnetic resonance imaging of multiple sclerosis lesions. Measuring outcome in treatment trials. *West. J. Med.* 164:502-9.

Sørensen T.L., Tani M., Jensen J., Pierce V., Lucchinetti C., Folcik V.A., Qin S., Rottman J., Sellebjerg F., Strieter R.M., Frederiksen J.L., Ransohoff R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103:807-815.

Sospedra M., Martin R., 2005. Immunology of Multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23:683-747.

Soulika A.M., Lee E., McCauley E., Miers L., Bannerman P., Pleasure D., 2009. Initiation and Progression of Axonopathy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neurosci.* 29:14965-79.

Steinman L., 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:510-518.

Stevens D.B., Gould K.E., Swanborg R.H., 1994. Transforming growth factor- β 1 inhibits tumor necrosis factor-TNF- α /lymphotoxin production and adoptive transfer of disease by effector cells of autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 51:77-83.

Stoffel-Wagner B., 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* 145:669-679.

Storch M.K., Piddlesden S., Haltia M., Iivanainen M., Morgan P., Lassmann H., 1998. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann. Neurol.* 43:465-471.

Suthanthiran M., Morris R.E., Strom T.B., 1996. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am. J. Kidney Dis.* 28:159-17.

Svenningsen F.A., Kanje M., 1999. Estrogen and progesterone stimulate Schwann cell proliferation in a sex- and age-dependent manner. *J. Neurosci. Res.* 57:124-130.

Swamydas M., Bessert D., Skoff R., 2008. Sexual dimorphism of oligodendrocytes is mediated by differential regulation of signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* 87:3306-3319.

Swanborg R.H., 1995. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:4-13.

Swanborg R.H., 2001. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol. Rev.* 184:129-135.

Tansey M.G., McCoy M.K., Frank-Cannon T.C., 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 208:1-25.

Tanuma N., Kojima T., Shin T., Aikawa Y., Kohji T., Ishihara Y., Matsumoto Y., 1997. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA

in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 73:197-206.

Tanuma N., Shin T., Matsumoto Y., 2000. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J. Neuroimmunol.* 108:171-80.

Tapia-Gonzalez S., Carrero P., Pernia O., Garcia-Segura L.M., Diz-Chaves Y., 2008. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J. Endocrinol.* 198:219-230.

Tapia-Gonzalez S., Garcia-Segura L.M., Tena-Sempere M., Frago L.M., Castellano J.M., Fuente-Martin E., Garcia-Caceres C., Argente J., Chowen J.A., 2011. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. *J. Neuroendocrinol.* 23:365-370.

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. 1995. *Neurology.* 45:1277-1285.

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

Thessen Hedreul M., Gillett A., Olsson T., Jagodic M., Harris R.A., 2009. Characterization of Multiple Sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 210:30-39.

Tomassini V., Onesti E., Mainero C., Giugni E., Paolillo A., Salvetti M., Nicoletti F., Pozzilli C., 2005. Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76:272-275.

Trapp B.D., Nave K.A., 2008. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Annu. Rev. Neurosci.* 31:247-269.

Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M., Rudick R., Mörk S., Bö L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338:278-85.

Trojnar M.K., Malek R., Chroscinska M., Nowak S., Blaszczyk B., Czuczwar, S.J., 2002. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs. *Pol. J. Pharmacol.* 54:557-566.

Tsunoda I., Fujinami R.S., 2010. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 5:355-369.

Tufekci K.U., Meuwissen R., Genc S., Genc K., 2012. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.* 88:69-132.

- Vajda F.J., 2002. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J. Clin. Neurosci.* 9:4-8.
- Vukusic S., Confavreux C., 2006. Pregnancy and multiple sclerosis: the children of PRIMS. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 108:266-270.
- Vukusic S., Ionescu I., El-Etr M., Schumacher M., Baulieu E.E., Cornu C., Confavreux C., 2009. The Prevention of Post-Partum Relapses with Progestin and Estradiol in Multiple Sclerosis (POPARTMUS) trial: Rationale, objectives and state of advancement. *J. Neurol. Sci.* 286:114-8.
- Wang J.M., Singh C., Liu L., Irwin R.W., Chen S., Chung E.J., Thompson R.F., Brinton R.D., 2010. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:6498-503.
- Weill-Engerer S., David J.P., Sazdovitch V., Liere, P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E.E., Akwa, Y., 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:5138-5143.
- Winder G., Achiron A., 2011. Benign multiple sclerosis. *Harefuah.* 150:463-465.
- Witherick J., Wilkins A., Scolding N., Kemp K., 2011. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis.* doi:10.4061/2011/164608.
- Woodroffe M.N., 1995. Cytokine production in the central nervous system, *Neurology.* 45:S6-10.
- Wu F.S., Gibbs T.T. Farb D.H., 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.* 40:333-336.
- Yates M.A., Y. Li, P. Chlebeck T., Proctor A.A., Vandenbark H. Offner., 2010. Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 220:136-139.
- Yong V.W., Chabot S., Stuve O., Williams G., 1998. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology.* 51:682-689.
- Yong V.W., Zabad R.K., Agrawal S., Goncalves D.A., Metz L.M., 2007. Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J. Neurol. Sci.* 259:79-84.
- Young C.A., 2011. Factors predisposing to the development of multiple sclerosis, *QJM.* 104:383-386.
- Zhu Y., Bond J., Thomas P., 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2237-2242.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sinceramente il Prof. Tredici e il Prof. Cavaletti per questa opportunità. Inoltre ringrazio il Prof. Melcangi per il rapporto di collaborazione e per avermi accolto presso il dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari.

Un ringraziamento va a tutta l'equipe del vecchio DNTB che mi ha sostenuto in questi mesi deliranti dandomi coraggio e appoggio nei momenti di maggior difficoltà. Un particolare ringraziamento va alla "schiacciasassi" Robi che mi ha portato ai primi congressi e senza il cui aiuto non avrei iniziato la stesura della tesi. Grazie per la lotta con i cuscini e per avermi aiutato a respirare... Grazie infinite alla "Silviagiatti" senza il cui aiuto non avrei finito la stesura della tesi e che mi aiuterà nell'importante preparazione della dissertazione finale. Tu e la Robi avete avuto tanta pazienza... Siete state le mie co-tutors! Grazie alla Ziche per la grande competenza, per aver risposto a tutti i miei dubbi sulla SM e per l'affetto dimostratomi... Dai che ci siamo quasi! Grazie a Betta che, così come per la laurea specialistica, è stata fondamentale nella creazione finale del pdf e mi ha evitato il defenestramento del pc! Grazie alla Cri che tra le lacrime e il sudore di luglio e agosto mi ha proposto l'adozione! Grazie alla mia "grissinona" per essere stata la mia prima coinquì nella mia prima casetta a Vedano! Grazie per i piacevoli momenti sul balcone, per i corn-flakes sul divano, per la casetta di zenzero decorata con tizzoni ardenti di zucchero caramellato e smarties, per avermi insegnato cos'è una basla e per avermi tenuto la mano in quella notte...

Grazie a Mario per avermi dedicato il pezzo di Gaber "c'ho l'ansia", per la sua passione e coerenza e per avermi temprato il carattere con i suoi: "Ritieniti schiaffeggiata!". Grazie a Dana per avermi insegnato a far scivolare le cose addosso con la naturale grazia che solo a lei è concessa... Ci sto provando!

Un particolare ringraziamento va alla mia collega, coinquilina e infine amica... La mia Caldarina che ha rischiato di bruciare tra le fiamme e che ha vissuto con me fianco a fianco tutte le fasi "ossessivocompulsiveborderline" durante la stesura della tesi! Grazie per la tua capacità di cambiare discorso al momento giusto, per la tua assenza di filtri, per le sbirciatine tra le

persiane, per aver sopportato Cinzia- la gatta più pulciosa del cortile- e per avermi aiutato a crescere Gustavo! Ti lovvo!!!

Grazie alla Ju per avermi aiutato da Bristol ad arricchire la tesi e per avermi presentato il mitico SMI32! Grazie a Lucio per avermi lanciato nel mondo delle neocaridine, delle *planorbarius corneus* e di quelle altre lumache a punta di cui non ricordo mai il nome!

Infine grazie alla Virgi e “alla sua pancia” per aver riso con me, pianto con me, parlato con me e per avermi accolto tra le sue braccia “di mamma” nel peggior momento della mia vita... Per avermi insegnato tante cose da un punto di vista lavorativo ma soprattutto da un punto di vista umano!

Grazie alle Enze per aver presenziato al famoso momento in cui dissi: “Io non farò mai il dottorato!” e per aver sempre creduto in me al posto mio! Vi siete disperse a Roma, a Cislago e a New York ma siete sempre nel mio cuore! Le nostre strade non si sono divise! Grazie alla mia sister Silvia che dopo 20 anni di amicizia è ancora presente e sempre pronta a spronarmi... “Io e te per sempre, a passeggio tra le strade di Affori!”. Grazie alla Kia per i numerosi pranzetti in lab. e per le nostre “sedute terapeutiche” sul significato dell’amore. Grazie a Barattini che in questi anni mi ha fatto da “madre, padre e zio”!

Come non ringraziare il mio Alberto che ha affrontato con me ben 3 tesi con psicosi e deliri annessi! Ti prometto che questa tesi sarà l’ultima ma credo anche la più importante dato che la sua conclusione determinerà, in una direzione o nell’altra, un cambiamento nel nostro percorso.

Infine il ringraziamento più importante va a mamma, papà, al mio fratellone Paolo, alla zia Maria e alla mia futura cognata Dani.

In questi due anni di semi-distacco da casa ho imparato che la famiglia è davvero l’unica cosa su cui si può contare sempre!

Ci sarebbero ancora molte persone da ringraziare ma, se non avete trovato il Vostro nome, non rimaneteci male! Voglio bene a tutti Voi. Ho raccolto passo dopo passo pezzetti di voi stessi che avete lasciato lungo il percorso e per questa dote preziosa Vi ringrazio! Ma non vedo l’ora di mettere un punto a questa tesi quindi...

THIS IS THE END.