

**Università degli Studi del Piemonte
Orientale**

“Amedeo Avogadro”

Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

(XVIII Ciclo)

RELAZIONE 2° ANNO:

**“Apoptosi Fas mediata in linfociti T di
pazienti con Polineuropatia**

Infiammatoria Demielinizzante Cronica”

Responsabile scientifico:

Prof. Francesco Monaco

Dottorando:

Cristoforo Comi

Patogenesi delle neuropatie disimmuni

Introduzione

Le neuropatie disimmuni sono un gruppo di malattie del sistema nervoso periferico la cui causa si ritiene essere legata ad una aggressione del sistema immunitario contro antigeni del nervo periferico (Tabella 1). Tale gruppo di malattie si è molto ampliato negli ultimi anni, includendo oltre alla sindrome di Guillain-Barré (GBS) e la polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP), numerose varianti di tali malattie, nonché nuove entità nosologiche, quali la neuropatia motoria multifocale e la sindrome di Lewis Sumner. Inoltre dopo le prime dimostrazioni negli anni '80 di una frequente reattività anticorpale della componente monoclonale con un antigene della mielina periferica in pazienti con neuropatia associata a gammopatia monoclonale IgM, e di anticorpi anti-neurone in pazienti con neuronopatia sensitiva paraneoplastica, tale capitolo si allargato ad includere le neuropatie associate a gammopatia monoclonale e le neuropatie paraneoplastiche.

Sindrome di Guillain-Barré

La sindrome di Guillain-Barré (GBS) è una poliradiculopatia infiammatoria ad esordio acuto, la cui incidenza annuale è di 0,6–4 casi/100 000 [1]. Sebbene gran parte dei pazienti presenti la tipica forma clinica di polineuropatia acuta infiammatoria demielinizzante (AIDP), negli ultimi anni numerose varianti di tale sindrome sono state descritte con selettiva compromissione distrettuale, quali la sindrome di Miller Fisher caratterizzata dalla triade oftalmoplegia, atassia e areflessia, le varianti oculofaringea, facciale, paraparetica, o funzionale, quali le forme puramente motorie, sensitive e autonome [2]. Analogamente, dal punto di vista anatomopatologico, accanto alla classica forma demielinizzante, sono state descritte forme primitivamente assonali motorie dette neuropatia acuta assonale motoria (AMAN) o sensitivomotorie (AMSAN) [3, 4], ampliando, di fatto, i confini di questa sindrome. La GBS si manifesta frequentemente dopo un episodio infettivo, che coinvolge nella maggior parte dei casi il tratto respiratorio o gastrointestinale e i cui agenti infettivi più frequentemente implicati sono il Citomegalovirus, il virus di Epstein-Barr, il *Mycoplasma Pneumoniae* e il *Campylobacter Jejuni* [5]. Sebbene queste evidenze epidemiologiche abbiano portato a formulare diverse ipotesi sul possibile nesso patogenetico tra gli antecedenti infettivi e il danno nervoso nella malattia l'ipotesi attualmente più accreditata è quella che la malattia sia causata da una risposta immunitaria (cellulare e/o anticorpale, vedi in seguito) primariamente diretta contro un antigene o un epitopo presente sull'agente infettivo, che è presente anche a livello del tessuto nervoso che viene pertanto coinvolto nella risposta immunitaria per un fenomeno di *molecular mimicry* (mimetismo molecolare) [6, 7]. Numerosi dati avvalorano l'ipotesi sia di un coinvolgimento dell'immunità cellulo-mediata sia di quella umorale nella patogenesi della GBS. Il possibile ruolo dell'immunità cellulare è suffragato da molteplici dati sperimentali: dalla presenza di infiltrati linfocitari a livello del nervo; dal riscontro nel sangue dei pazienti di un elevato numero di linfoblasti circolanti, alcuni dei quali sensibilizzati verso le proteine mieliniche P0 e P2; dagli aumentati livelli serici in fase acuta di citochine pro-infiammatorie e Th1 quali TNF- α , interleuchina 2 (IL-2) e il suo recettore solubile (sIL-2R), e IL-1 che si riducono

durante il recupero, parallelamente all'incremento della citochina antinfiammatoria TGF- β 1; dal fatto che il modello animale di GBS, cioè la neurite allergica sperimentale (EAN), può essere trasferita passivamente ad animali sani mediante linfociti CD4+ sensibilizzati alla P2 provenienti da animali affetti e dalla capacità di tali linfociti di distruggere *in vivo* mielina di nervo periferico [6]. Per quanto riguarda invece il possibile ruolo della immunità umorale nella patogenesi della GBS, il dato più rilevante è rappresentato dalla risposta positiva alla terapia con plasmateresi o immunoglobuline ad alte dosi [8, 9], entrambe ritenute efficaci nelle patologie anticorpo mediate e dalla frequente associazione di tale malattia con anticorpi di tipo IgG contro vari antigeni del nervo ed in particolare i gangliosidi GM1, il GD1a, GT1a, GM2, GQ1b e altri gangliosidi minori [6, 7]. La presenza di tali anticorpi è stata correlata sia con forme particolari di GBS, quali la AMAN o AMSAN per gli anticorpi anti-GM1 e anti-GD1a, la AIDP per quelli anti-GM2 e la sindrome di Miller Fisher per quelli anti-GQ1b, sia con determinati antecedenti infettivi, tra cui in particolare il *C. jejuni* per gli anti-GM1, -GQ1b e -GD1a e il Citomegalovirus per quanto riguarda gli anti-GM2. Tali associazioni, sebbene spesso statisticamente significative, non sono sempre presenti, così che il ruolo non solo diagnostico e prognostico ma anche quello patogenetico di questi anticorpi rimane da chiarire, nonostante vi siano ormai numerosi studi che dimostrano la capacità di tali anticorpi di alterare *in vitro* la trasmissione nervosa [10], nonché la possibilità di indurre in animali forme di GBS mediante immunizzazione con ganglioside [11].

Polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante

La polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP) è una polineuropatia cronica demielinizzante che esordisce talvolta come la GBS (da cui il termine un tempo usato di Guillain-Barré cronica), ma che spesso presenta fin dall'inizio un andamento cronico [12]. In circa la metà dei casi (soprattutto nei giovani) la malattia ha un andamento cronico recidivante, mentre nei restanti pazienti (soprattutto anziani) ha un andamento cronico progressivo fin dall'inizio. La prognosi a lungo termine di tale malattia è buona in circa la metà dei pazienti, capaci di condurre una vita del tutto autonoma dieci anni dopo l'inizio della malattia, mentre il 30–40% di loro presenta dopo tale periodo qualche limitazione funzionale e il restante 10% presenta una prognosi vitale o funzionale infausta [13].

La eziopatogenesi della CIDP è a tutt'oggi sconosciuta anche se vi sono numerosi dati a favore di una origine autoimmunitaria di tale malattia [14]. Tale ipotesi è suffragata dal frequente riscontro a livello della biopsia del nervo periferico di infiltrati infiammatori, soprattutto macrofagi e, in misura minore, linfociti T, dalla frequente associazione

con alcuni antigeni di istocompatibilità, in particolare HLA-B8, la frequente risposta clinica a terapie immunosoppressive o immunomodulanti quali steroidi, plasmaferesi ed immunoglobuline ad alte dosi, la possibilità di indurre nel coniglio un modello sperimentale di polineuropatia cronica demielinizzante molto simile alla CIDP, mediante immunizzazione con mielina periferica o galattocerebroside, e la possibilità di indurre demielinizzazione del nervo di animale mediante inoculazione del siero di pazienti con CIDP. Sebbene tutti questi dati siano consistenti con l'ipotesi di una risposta autoimmune contro il nervo in tale malattia, rimane tuttora sconosciuto quale sia l'antigene bersaglio di tale risposta nell'uomo, nonché il ruolo relativo della risposta immunitaria cellulo- e anticorpo-mediata nella CIDP, e, soprattutto quale sia la causa di tale risposta autoimmune che, a differenza di quanto ipotizzato nella sindrome di Guillain-Barré, non sembra essere innescata da una precedente evento infettivo, riportato solo nel 30% dei pazienti con CIDP.

Numerose reattività anticorpali contro componenti o antigeni del nervo sono state descritte in tale malattia ,quali la mielina periferica, cellule di Schwann o di neuroblastoma, alcune proteine del nervo quali la P0 e un suo analogo di 35 kDa, la PMP22, la P2, la β -tubulina e numerosi glicolipidi quali il galattocerebroside, solfatidi, SGPG, asialoGM1, gangliosidi GM1 e LM1 [15]. Tutte queste reattività sono state tuttavia riscontrate o in una piccola percentuale di pazienti o, come nel caso degli anticorpi anti- β -tubulina, il loro riscontro in una elevata percentuale di pazienti [16] non è stata confermata da altri ricercatori [17]. Più recentemente è stata dedicata nuova attenzione agli anticorpi contro la proteina P0 nel siero di pazienti con CIDP, di cui è stata dimostrata la capacità di indurre demielinizzazione *in vivo* mediante inoculazione nel nervo di ratto [18]. Tali anticorpi sono stati però riscontrati in non più del 30% dei pazienti con CIDP, indicando che tutt'al più essi possono essere implicati in una minoranza di loro. Tale dato, insieme alla mancanza di dati in questo studio sulla presenza di tali anticorpi in pazienti con forme diverse di neuropatia, non permette di stabilire quale sia la rilevanza di tale reattività nella CIDP.

Sempre nell'ambito delle alterazioni immunologiche umorali nella CIDP, vi sono poi alcuni lavori che dimostrano una alterazione delle citochine circolanti in tale malattia, quali un aumento della citochina pro-infiammatoria TNF- α nel 20–40% dei pazienti [19] ma non della interleuchina (IL) 1, mentre solo sporadicamente è stato segnalato un aumento di IL-2 e del recettore solubile di tale interleuchina (s-IL-2 R); dati questi comunque insufficienti a stabilire se in tale malattia vi sia una predominanza di una risposta Th1 rispetto a quella Th2.

Neuropatia motoria multifocale

La neuropatia motoria multifocale (NMM) è una neuropatia caratterizzata clinicamente da un interessamento puramente motorio a distribuzione multineuropatica che coinvolge prevalentemente e più precocemente gli arti superiori in modo asimmetrico e, dal punto di vista neurofisiologico, dalla presenza di blocchi di conduzione nei nervi motori ma non in quelli sensitivi, al di fuori dei normali siti di compressione [20]. Sebbene tale malattia si differenzi dalla forma precedentemente descritta da Lewis e colleghi e nota come sindrome di Lewis Sumner [21], per l'assenza di un concomitante coinvolgimento sensitivo e dalla mancata risposta al trattamento steroideo, il rapporto tra queste due malattie è ancora dibattuto [22]. La prevalenza della NMM non è nota anche se si stima essere intorno a 1–2 per 100 000.

La patogenesi della NMM non è del tutto nota, anche se la frequente risposta dei pazienti alla ciclofosfamide e alle immunoglobuline ad alte dosi (dato questo confermato in quattro studi randomizzati, in doppio cieco, controllati verso placebo su un totale di 46 pazienti) e la frequente associazione di tale malattia con anticorpi anti-gangliosidi fanno ipotizzare che sia di tipo immunomediato [20]. Gli anticorpi anti-gangliosidi sono stati descritti per la prima volta nella NMM da Pestronk et al. nel 1988 [23] e successivamente

sono stati ampiamente confermati in letteratura in una percentuale variabile di pazienti con NMM compresa tra il 30% e l'80%, discrepanza questa che probabilmente riflette, almeno in parte, differenze nelle procedure ELISA usate nei diversi laboratori [24]. Essi sono prevalentemente di tipo IgM e sono diretti principalmente contro il GM1 e meno frequentemente contro l'asialoGM1, il GD1a e il GM2. Sebbene tali anticorpi siano stati riscontrati occasionalmente anche in pazienti con altre patologie, tra cui la malattia del motoneurone (MND), numerosi studi tra cui una metanalisi [25, 26], confermano che il loro riscontro è utile nella diagnosi differenziale tra malattia del motoneurone e NMM, anche se la loro negatività non permette di escluderne la diagnosi.

Meno chiaro è il ruolo patogenetico di tali anticorpi nella NMM. Il riscontro di elevati titoli di anticorpi anti-GM1 IgM nel siero di pazienti affetti da NMM e la riduzione del

titolo anticorpale nei pazienti migliorati in seguito a trattamento con ciclofosfamide [23] aveva fatto ipotizzare che il GM1 potesse essere il bersaglio della risposta immunitaria. Il GM1 è inoltre altamente rappresentato nelle membrane del sistema nervoso periferico dove si localizza a livello dei nodi di Ranvier, della mielina compatta e non compatta e della placca motoria [27], con una maggiore rappresentazione a livello della mielina delle fibre motorie rispetto a quelle sensitive. Tali aspetti avevano fatto ritenere il GM1 un bersaglio ideale, anche se la concomitante localizzazione del GM1 (e reattività anticorpale) a livello delle strutture sensitive, dei motoneuroni spinali e nella sostanza grigia, non spiegano il

risparmio di tali strutture nella NMM [28]. Inoltre, numerosi pazienti che non presentano una reattività anticorpale anti-GM1 hanno comunque una buona risposta al trattamento

immunologico. Come già detto, alti titoli di anticorpi anti-GM1 sono stati riscontrati anche in pazienti con altre patologie quali la MND, le neuropatie sensitivo motorie, la CIDP e la GBS, e gli studi finora effettuati non hanno permesso di individuare differenze nella fine specificità antigenica tra gli anticorpi anti-GM1 riscontrati nelle diverse sindromi motorie. Rimane quindi difficile spiegare come gli stessi anticorpi possano provocare malattie diverse e cosa determini la NMM nei pazienti che non presentano reattività. Gli studi sperimentali fino ad ora condotti, *in vivo* e *in vitro*, non hanno portato a risultati più convincenti sul possibile ruolo patogenetico del GM1, dal momento che un simile effetto bloccante è stato ottenuto *in vitro* sulla conduzione distale dei nervi motori di topo con il siero di pazienti con NMM con e senza anticorpi anti-GM1 [29]. Tali dati sembrano avvalorare l'ipotesi che nel siero di tali pazienti è presente un fattore solubile capace di indurre blocchi di conduzione, anche se non necessariamente tale fattore è costituito dagli anticorpi anti-GM1.

Neuropatie in corso di gammopatia monoclonale

Sebbene l'associazione tra neuropatia e gammopatia monoclonale sia nota da anni, le ricerche in questo ambito hanno avuto un particolare impulso negli anni '80 quando Latov et al. [30] hanno per la prima volta identificato la reattività del siero di un paziente affetto da neuropatia e gammopatia MGUS IgM verso un antigene della mielina periferica (glicoproteina associata alla mielina – MAG) e Kelly et al. [31] in uno studio retrospettivo condotto su 692 pazienti affetti da neuropatia hanno riscontrato la presenza di gammopatia monoclonale nell'8,4% di quelli in cui la causa era sconosciuta. La prevalenza di neuropatia sintomatica nei pazienti con gammopatia monoclonale varia, per le diverse forme e nelle diverse casistiche, tra l'8% e il 36% con una incidenza significativamente maggiore nelle gammopatie di tipo IgM [32]. Tale dato correla con il fatto che in circa 2/3 dei pazienti con neuropatia associata a gammopatia monoclonale IgM la paraproteina IgM ha una reattività anticorpale contro differenti antigeni neurali (MAG, solfatidi, condroitin solfato, proteine del citoscheletro e gangliosidi) [33]. Tali reattività anticorpali si associano spesso a caratteristici quadri clinici, dato questo che ne avvalorava la rilevanza clinica e ne suggerisce un possibile ruolo patogenetico (Tabella 2). La più frequente delle neuropatie associate a gammopatia monoclonale IgM è quella da IgM anti-MAG, reattività questa riscontrata in circa il 50% dei pazienti con neuropatia e gammopatia IgM, nei quali è associata a una concomitante reattività con altri glicoconiugati del nervo (P0, PMP22, SGPG, SGLPG) aventi in comune con la MAG uno stesso epitopo carboidratico (HNK-1) [33]. Numerosi dati avvalorano il possibile ruolo patogenetico di tali anticorpi nella neuropatia. In oltre il 90% dei pazienti, infatti, essi sono associati a una polineuropatia con caratteristiche cliniche, elettrofisiologiche e morfologiche molto omogenee con prevalente compromissione sensitiva atassica, tremore agli arti superiore, decorso molto lento, marcata riduzione delle velocità di conduzione con anche maggiore incremento delle latenze distali e slamellamento periferico delle guaine mieliniche con depositi della paraproteina IgM e di complemento a livello della mielina [34–37]. Inoltre, i pochi pazienti asintomatici, in cui tali anticorpi sono presenti, sviluppano nel corso degli anni tale neuropatia [38]. In tali pazienti la

riduzione terapeutica dei titoli anticorpali, sebbene difficile da raggiungere con le terapie attuali [39], si associa ad un miglioramento clinico dei pazienti. Vi sono poi studi sperimentali che dimostrano la possibilità di indurre una demielinizzazione complementomediata in animali mediante iniezione intraneurale o sistemica di siero di paziente con IgM anti-MAG [40]. Meno definito è invece il possibile ruolo patogenetico delle altre reattività anticorpali associate a neuropatie in corso di gammopatia monoclonale IgM, anche se tra queste va ricordata la neuropatia associata ad anticorpi antisolfatidi, che rappresenta la seconda reattività più frequentemente riscontrata in questi pazienti, essendo presente in circa il 6–8% dei pazienti [33, 41–43]. Sebbene tale reattività sia stata infatti associata a diverse forme di neuropatia, gli studi morfologici condotti su biopsia di nervo surale di pazienti con forme demielinizzanti dimostrano aspetti analoghi a quelli riscontrati nella neuropatia con IgM anti-MAG, inclusi lo slamellamento periferico delle guaine mieliniche e i depositi di paraproteina e complemento a livello della mielina [33]. Il numero assai limitato di pazienti finora descritti con altre reattività non permette invece di chiarire il possibile ruolo patogenetico di tali reattività anche perché in nessuno dei pazienti sono stati riscontrati depositi a livello dei nervi e poco si sa riguarda alla risposta al trattamento. Analogamente, rimane molto incerto il ruolo patogenetico della gammopatia monoclonale IgG e IgA nella neuropatia anche perché solo in pochi pazienti è stata descritta, in modo peraltro poco convincente e scarsamente ripetibile, una reattività della paraproteina verso antigeni neurali o depositi della medesima a livello del nervo [44, 45]. Inoltre, nella maggiore parte dei pazienti la gammopatia si evidenzia alcuni anni dopo l'esordio della neuropatia, fatto questo che sembra poco compatibile con un ruolo patogenetico primitivo della gammopatia sulla neuropatia. Tuttavia sono stati recentemente individuati due pazienti con neuropatia demielinizzante in corso di MGUS IgA che presentavano a livello del nervo surale i tipici slamellamenti della mielina già descritti nei pazienti con IgM anti-MAG, oltre a depositi della paraproteina IgA a livello mielinico [46], dati questi che suggeriscono che anche in alcuni di questi pazienti la gammopatia monoclonale possa avere un ruolo patogenetico nella neuropatia.

Tabella 1 Neuropatie disimmuni

Sindrome di Guillain Barré:

AIDP

AMAN & AMSAN (forma assonale)

Sindrome di Miller Fisher

Altre varianti (forma sensitiva, motoria, disautonomica, oculofaringea, paraparetica etc.)

Forma ricorrente

Polineuropatia infiammatoria demielinizzante *subacuta*

Polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP)

Forma cronica recidivante (*relapsing*)

Forma cronica progressiva

Forma assonale recidivante

Neuropatia motoria multifocale con (NMM) o senza blocchi di conduzione (NM)

Neuropatia multifocale demielinizzante (sensitivo-motoria) (MDN) (malattia di Lewis Sumner)

Polineuropatie associate a gammopatia monoclonale

IgG (?)

IgA (?)

IgM

Anti-MAG

Non anti-MAG:

Antigene noto (solfatidi, GM1, GM2, GD1b, GD1a, ChSC, ...)

Antigene non noto (?)

Polineuropatie paraneoplastiche

Neuronopatia sensitiva subacuta

Con anticorpi anti-Hu (soprattutto in microcitoma polmonare)

Senza anticorpi anti-Hu

Neuronopatia motoria subacuta (?)

Neuropatie vasculitiche

Tabella 2 Reattività anticorpali di più frequente riscontro e loro correlato clinico-patologico nei pazienti con neuropatia associata a gammopatia monoclonale IgM

Antigene Caratteristiche Patologia del nervo

Frequenza* Cliniche#

MAG/SGPG/P0 50–60% S>>M Demielinizzazione

Solfatidi 6% S, S>>M, SM Degener. assonale o Demielinizzazione

Condroitin solfato C <2% SM Degener. assonale

Gangliosidi:

GM1+/-GD1b <2% NMM or M Dem. focale

Disialo-gangliosidi: 2% S>>M Demielinizzazione

GQ1b, GD1b, GT1b, GD3, GD2

GD1a 3% M Demielinizzazione

GD1b <2% SM Deg. Assonale

GM2 <2% NMM or M ?

* [33] e dati non pubblicati; # neuropatia

SM, sensitivomotoria; *S*, Sensitiva; *S>>M*, prevalentemente sensitiva; *M*, motoria;

NMM, neuropatia motoria multifocale

Ruolo dell'apoptosi dei linfociti T nella patogenesi della CIDP

Numerose evidenze supportano un possibile ruolo dell'apoptosi dei linfociti T nella patogenesi della CIDP, in particolare nel processo di spegnimento della risposta immune. Ad oggi i fattori che determinano lo spegnimento versus la persistenza della risposta immune nella CIDP non sono completamente chiari [47]. E' stato proposto che i linfociti T attivati possano essere rimossi attraverso due meccanismi: 1) apoptosi indotta dall'attivazione del sistema Fas/FasL e 2) morte dovuta a privazione di citochine [48]. Il lavoro di Wohlleben et al. suggerisce che cellule di Schwann esprimenti FasL possano contribuire all'eliminazione dei linfociti autoreattivi [49]. E' possibile che un difetto di interazione Fas/FasL determini la persistenza della reazione infiammatoria e il decorso cronico progressivo della CIDP [47]. In accordo con questa ipotesi, Gold et al. hanno dimostrato che nel modello animale della CIDP, la neurite autoimmune sperimentale (EAN), si osserva apoptosi dei linfociti T, con livelli più marcati in fase di remissione [50], ad indicare quindi un possibile ruolo di questo fenomeno nello spegnimento dell' infiammazione a livello del sistema nervoso periferico.

D'altra parte, un difetto di spegnimento della risposta immune è già stato descritto in numerose malattie autoimmuni, compresa la sclerosi multipla, malattia che condivide molti aspetti con la CIDP [51], come dimostrano tra gli altri lavori prodotti dal nostro gruppo [52, 53].

Un interessante lavoro di un gruppo statunitense [54], in cui vengono descritte le possibili presentazioni cliniche di soggetti con mutazioni nel gene del recettore Fas, ci permette di testare l'ipotesi da un'altra prospettiva. Una neuropatia infiammatoria viene infatti descritta come possibile quadro clinico in questi pazienti.

L'insieme delle evidenze descritte ci ha suggerito di studiare la funzione linfocitaria di Fas in pazienti con CIDP, per valutare se vi fosse un'aumentata frequenza di difetti nella funzione di tale via apoptotica e secondariamente se vi fossero caratteristiche cliniche peculiari nei pazienti con difetti della funzione di Fas.

Pazienti e metodi

Abbiamo studiato 21 pazienti (15 m, 6 w, età media 61 ± 13 anni) con CIDP secondo i criteri diagnostici proposti dalla American Academy of Neurology [55]. 13 pazienti (62%) avevano decorso cronico progressivo, 8 pazienti (38%) decorso recidivante remittente. 17 pazienti presentavano una forma demielinizzante pura, 4 pazienti una forma mista demielinizzante/assonale.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esami di laboratorio di routine (volti ad escludere altre cause di neuropatia), esame del liquor, EMG. In particolare la valutazione neurofisiologica comprendeva: velocità di conduzione motoria e sensitiva, potenziali d'azione di nervo e di muscolo, e latenza dell'onda F.

Analisi dell'immunofenotipo.

Cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) sono state isolate mediante centrifugazione a gradiente (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway) e colorate immediatamente mediante immunofluorescenza. E' stata valutata l'espressione di molecole di superficie mediante immunofluorescenza diretta e analisi citofluorimetrica (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Sono stati usati I seguenti anticorpi monoclonali (MAb): anti-CD3 (Leu-4), -CD4 (Leu-3a), -CD8 (Leu-2a), -TCR a/b (Becton Dickinson), -Fas (Immunotech, Marseilles, France). Le cellule positive per CD4 e CD8 DN TCR a/b sono state rilevate mediante immunofluorescenza bicolore, usando un MAb anti-TCR a/b coniugato-FITC e MAbs anti-CD4 e CD8 coniugati-PE.

Fas è stato rilevato mediante immunofluorescenza bicolore su linfociti "resting" o attivati, usando un MAb anti-CD3 coniugato-PE e MAb coniugato-FITC a HLA-DR, CD25 (Becton Dickinson), e Fas (Chemicon, Temecula, CA).

La fluorescenza aspecifica di sottofondo è stata stabilita con un appropriato MAb controllo "isotype-matched" (Becton Dickinson). La densità antigenica è stata espressa come rapporto di intensità mediana di fluorescenza (MFI-R) dei linfociti totali secondo la seguente formula: $MFI-R = \frac{MFI \text{ dell'istogramma campione (unità arbitrarie)}}{MFI \text{ dell'istogramma controllo (unità arbitrarie)}}$

Analisi dell' apoptosi Fas-indotta La morte cellulare Fas-indotta è stata valutata come descritto in precedenza [52] su linee di linfociti T ottenuti attivando le PBMC con PHA ai giorni zero (1 mg/ml) e 15 (0.2 mg/ml) e coltivate in terreno RPMI 1640 + 10% FCS + IL-2 ricombinante (5 U/ml) (Biogen, Geneva, Switzerland). La funzione di Fas è stata testata 6 giorni dopo la seconda stimolazione (19 giorni di coltura).

Le cellule sono state incubate con terreno di controllo o MAb anti-Fas (IgM isotype) (1 mg/ml) (UBI, Lake Placid, NY) in presenza di rIL-2 (5 U/ml) per minimizzare la morte spontanea. La sopravvivenza cellulare è stata valutata dopo 18 ore contando le cellule vive in ogni pozzetto mediante test di esclusione al blu tripano.

I risultati sono stati espressi come % di sopravvivenza cellulare specifica, calcolata come segue: (totale delle cellule vive nel pozzetto campione/ totale delle cellule vive nel pozzetto controllo) x 100

L'intervallo di risposta normale alla morte T linfocitaria Fas indotta è stato definito come media +2DS dei dati ottenuti dai test controllo effettuati dal nostro laboratorio negli anni (60 ± 22).

Risultati

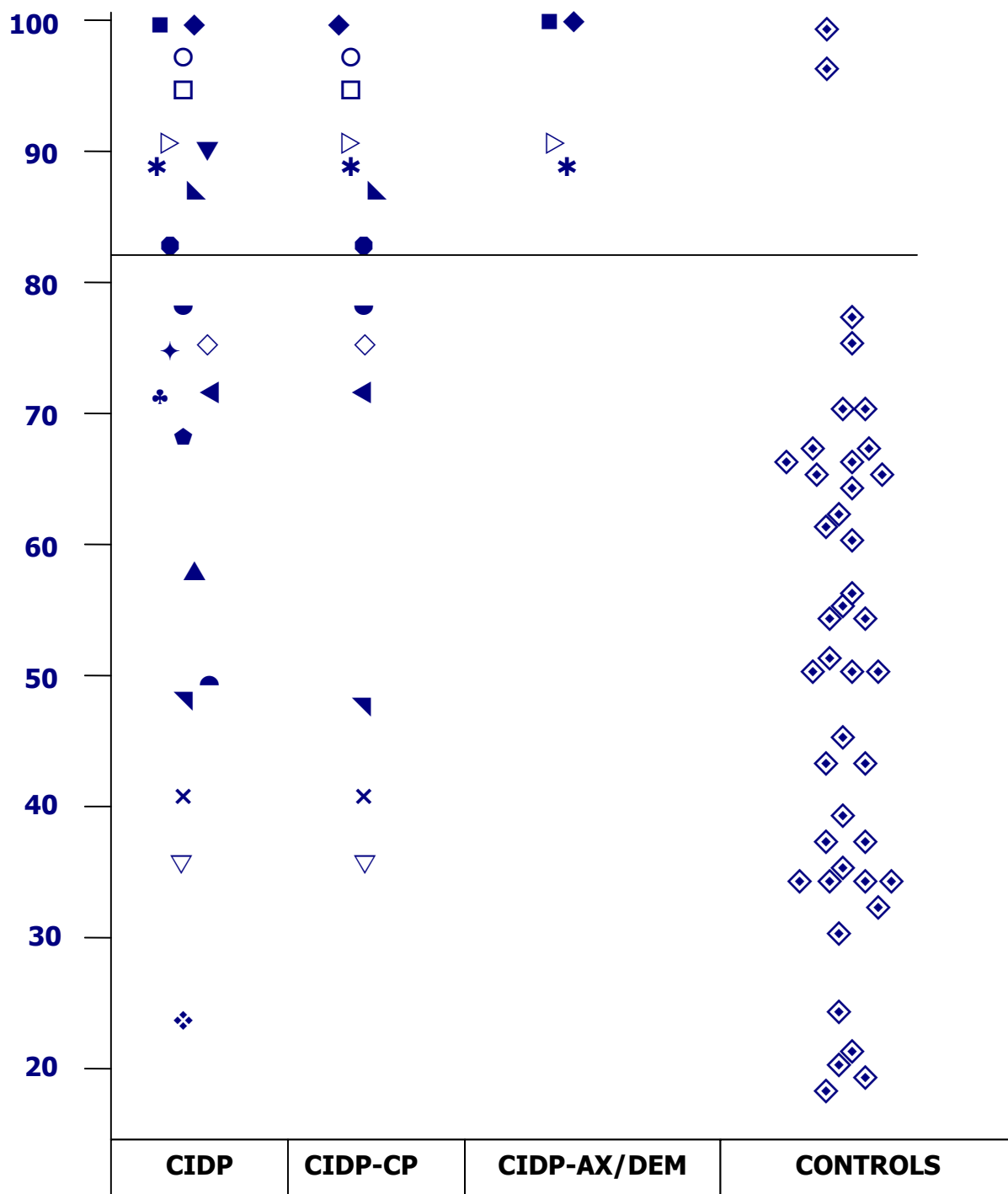
L'espressione di Fas è stata valutata in ogni linea T linfocitaria mediante immunofluorescenza diretta lo stesso giorno in cui è stato effettuato il test di morte cellulare ed è sempre risultata nei valori di normalità. La ricerca di linfociti T DN su PBM freschi mediante immunofluorescenza bicolore non ha mai rivelato espansione di queste cellule (la conta dei linfociti T DN era sempre <5%)

Abbiamo quindi valutato la risposta alla morte cellulare innescata da Fas in linee di linfociti T. I pazienti con CIDP mostravano una sopravvivenza cellulare significativamente più alta rispetto ai controlli dopo trattamento con Mab anti-Fas. Inoltre, i dati sui singoli pazienti dimostrano che la % di Fas-R è significativamente più alta nei pazienti con CIDP (43%) rispetto ai controlli (5%). (Tabella 3). Tali riscontri avvalorano l'ipotesi che un difetto della via di Fas a livello T linfocitario possa essere un fattore predisponente la malattia. È interessante inoltre rilevare che la % di Fas-R è del tutto simile a quella dei pazienti con SM (39%) [53].

Per quanto riguarda l'analisi della Fas resistenza nei pazienti con differente decorso clinico, si può osservare come la % di Fas-R risulti significativamente più alta nei pazienti con CIDP-CP (54%) rispetto ai CIDP-RR (25%). Considerando infine i pazienti che alla valutazione neurofisiologica presentano segni di danno assonale, si riscontra una % di Fas-R significativamente più alta (100%) nei pazienti con CIDP con danno assonale rispetto ai pazienti con forma demielinizzante pura (35%) (Figura 1).

			Anti-Fas Mab	
Gruppo	n	Espressione di Fas (MFI-R)	Resistenti	Sopravvivenza cellulare relativa (%)
Controlli	42	11.1±5.6	2 (5%)	51
Pazienti CIDP	21	16.6±7.9	9 (43%) (p<0.05)	75 (p<0.05)

Tabella 3.



Discussione

Il principale dato del lavoro è che i pazienti con CIDP dimostrano una frequenza significativamente più alta di resistenza all'apoptosi Fas mediata rispetto ai controlli sani.

Soggetti con un difetto genetico dell'apoptosi Fas mediata possono presentare un quadro clinico caratterizzato da aumentata frequenza di malattie autoimmuni, compresa la SM e le neuropatie infiammatorie, e da neoplasie maligne denominato sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS). In precedenza abbiamo dimostrato che pazienti con SM hanno una frequenza più elevata rispetto ai controlli di difetti dell'apoptosi Fas mediata [53].

L'apoptosi svolge importanti funzioni nel sistema immunitario, tra cui l'induzione della tolleranza periferica e lo spegnimento della risposta immune [56].

Un lavoro precedente ha mostrato che, esattamente come avviene nella EAE, anche nella EAN i linfociti T autoreattivi vengono eliminati per apoptosi [50]; si può pertanto ipotizzare che un difetto di eliminazione di cellule patogenetiche possa essere un fattore predisponente la malattia.

L'analisi del decorso clinico, sebbene effettuata su un campione di dimensioni ridotte, dimostra che i pazienti con difetto della funzione linfocitaria di Fas sembrano avere una prognosi peggiore, dal momento che presentano più spesso decorso progressivo e una frequenza elevata di danno assonale allo studio neurofisiologico.

In conclusione, i dati in nostro possesso indicano che difetti dell'apoptosi possono rivestire un ruolo importante nel creare una predisposizione allo sviluppo di neuropatie infiammatorie croniche, in particolare di forme croniche progressive e con danno assonale. Per confermare la validità del dato sarebbe opportuno seguire i pazienti dall'esordio, in uno studio longitudinale, valutando inoltre eventuali correlazioni tra funzione T linfocitaria di Fas e dati neurofisiologici.

Bibliografia

1. Ropper AH (1992) The Guillain-Barré syndrome. *N Eng J Med* 326:1130–1136
2. Ropper AH (1994) Miller Fisher Syndrome and other acute variants of Guillain-Barré syndrome. *Baillière's Clinical Neurology* 3:95–106
3. McKhan GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho W et al (1993) Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol* 33:333–342
4. Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M et al (1996) Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 39:17–28
5. Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FGA, Herbrink P et al (1998) The spectrum of antecedent infections in Guillain Barré syndrome. A case-control study. *Neurology* 51:1110–1115
6. Hughes RAC, Hadden RDM, Gregson NA, Smith KJ (1999) Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 100:74–97
7. Willison HJ, Yuki N (2002) Peripheral neuropathies and antiglycolipid antibodies. *Brain* 125:2591–2625
8. French Cooperative Group on Plasma Exchange in Guillain-Barré Syndrome (1987) Efficiency of plasma exchange in Guillain-Barré Syndrome: role of replacement fluids. *Ann Neurol* 22:753–761
9. van der Meché FGA, Schmitz PIM and the Dutch Guillain-Barré Study Group (1992) A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain Barré syndrome. *N Eng J Med* 326:1123–1129
10. Buchwald B, Bufler J, Carpo M, Heidenreich F et al (2001) Combined pre- and postsynaptic action of IgG antibodies in Miller Fisher syndrome. *Neurology* 56:67–74
11. Yuki N, Yamada M, Koga M et al (2001). Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 49:712–720
12. Dyck PJ, Prineas J, Pollard J (1993) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (eds) *Peripheral Neuropathy*, 3rd edn. WB Saunders, Philadelphia, pp 1498–1517

13. McCombe PA, Pollard JD, McLeod JG (1987) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain* 110:1617–1630
14. Hartung HP, Reiners K, Toyka KV, Pollard JD (1994) Guillain Barré syndrome and CIDP. In: Hohlfeld R (ed) *Immunology of neuromuscular disease*, Kluwer, Dordrecht, pp 39–104
15. Melendez-Vasquez C, Redford J, Choudary PP et al (1997) Immunologic investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 73:124–134
16. Connolly AM, Pestronk A, Trotter JL et al (1993) High-titer selective serum anti- β -tubulin antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 43:557–562
17. Manfredini E, Nobile-Orazio E, Allaria S, Scarlato G (1995) Anti-alpha- and beta-tubulin IgM antibodies in dysimmune neuropathies. *J Neurol Sci* 133:79–84
18. Yan WX, Archels JJ, Hartung H-P, Pollard JD (2001) P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 50:286–292
19. Misawa S, Kuwabara S, Mori M et al (2001) Serum levels of tumor necrosis factor- α in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 56:666–669
20. Nobile-Orazio E (2001) Multifocal motor neuropathy. *J Neuroimmunol* 115:4–18
21. Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK (1982) Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology* 32:958–964
22. Saperstein DS, Amato AA, Wolfe GI et al (1999) Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy: the Lewis-Sumner syndrome. *Muscle Nerve* 22:560–566
23. Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas A et al (1988) A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 24:73–78
24. Holloway RG, Feasby T (1999) To test or not to test? That is the question in neurology. *Neurology* 53:1905–1907

25. van Schaik IN, Bossuyt PMM, Brand A, Vermeulen M (1995) Diagnostic value of GM1 antibodies in motor neuron disorders and neuropathies: a meta analysis. *Neurology* 45:1570–1577
26. Taylor BV, Gross LA, Windebank AJ (1996) The sensitivity and specificity of anti-GM1 antibody testing. *Neurology* 47:951–955
27. Wiegandt H (1985) Gangliosides. In: Wiegandt H (ed), *Glycolipids*. Elsevier, Amsterdam, pp 199–260
28. O’Hanlon GM, Paterson GJ, Wilson G et al (1996) Anti-GM1 ganglioside antibodies cloned from autoimmune neuropathy patients show diverse binding patterns in the rodent nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:184–195
29. Roberts M, Willison HJ, Vincent A, Newsom-Davis J (1995) Multifocal motor neuropathy human sera block distal motor nerve conduction in mice. *Ann Neurol* 38:111–118
30. Latov N, Sherman WH, Nemni R et al (1980) Plasma cell dyscrasia and peripheral neuropathy with a monoclonal antibody to peripheral nerve myelin. *N Eng J Med* 303:618–621
31. Kelly JJ, Kyle RA, O’Brien PC, Dyck PJ (1981). Prevalence of monoclonal protein in peripheral neuropathy. *Neurology* 31:1480–1483
32. Nobile-Orazio E, Barbieri S, Baldini L et al (1992) Peripheral neuropathy in monoclonal gammopathy of undetermined significance: prevalence and immunopathogenetic studies. *Acta Neurol Scand* 85:383–390
33. Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M et al (1994) Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 36:416–424
34. Nobile-Orazio E, Meucci N, Baldini L et al (2000) Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG IgM Mproteins and its relation with immune therapies. *Brain* 123:710–717
35. Kaku DA, England JD, Sumner AJ (1994) Distal accentuation of conduction slowing in polyneuropathy associated with antibodies to myelin-associated glycoprotein and sulphated lucuronyl paragloboside. *Brain* 117:941–947

36. Vital A, Vital C, Julien J et al (1989) Polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. Immunological and pathological study in 31 patients. *Acta Neuropathol* 79:160–167
37. Monaco S, Bonetti B, Ferrari S et al (1990) Complement mediated demyelination in patients with IgM monoclonal gammopathy and polyneuropathy. *N Engl J Med* 322:649–652
38. Meucci N, Baldini L, Cappellari A et al (1999) Anti-MAG antibodies predict the development of neuropathy in asymptomatic patients with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 46:119–122
39. Lunn M, Nobile-Orazio E (2003) Immunotherapy for IgM anti-myelin-associated glycoprotein paraprotein associated neuropathy. *The Cochrane Library*. Issue 1. Update Software, Oxford
40. Monaco S, Ferrari S, Bonetti B et al (1995) Experimental induction of myelin changes by anti-MAG antibodies and terminal complement complex. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:96–104
41. Pestronk A, Li F, Griffin J, Feldman EL et al (1991) Polyneuropathy syndromes associated with serum antibodies to sulfatide and myelin-associated glycoprotein. *Neurology* 41:357–362
42. Carpo M, Meucci N, Allaria S et al (2000) Anti-sulfatide IgM antibodies in peripheral neuropathy. *J Neurol Sci* 176:144–150
43. Quattrini A, Corbo M, Dhaliwal SK et al (1992) Anti-sulfatide antibodies in neurological disease: binding to dorsal root ganglia neurons. *J Neurol Sci* 112:152–159
44. Nobile-Orazio E, Casellato C, Di Troia A (2002) Neuropathies associated with IgG and IgA monoclonal gammopathy. *Rev Neurol (Paris)* 158:979–987
45. Hermosilla E, Lagueny A, Vital C et al (1996). Peripheral neuropathy associated with monoclonal IgG of undetermined significance: clinical, electrophysiologic, pathologic and therapeutic study of 14 cases. *J Peripher Nerv Sys* 1:139–148
46. Vallat JM, Tabaraud F, Sindou P et al (2000) Myelin widenings and MGUS-IgA: an immunoelectron microscopic study. *Ann Neurol* 47:808–811

47. Rezaia K, Gundogdu B, Soliven B. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Front Biosci.* 2004 Jan 1;9:939-45.
48. Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev.* 2003 Jun;193:58-69.
49. Wohlleben G, Ibrahim SM, Schmidt J, Toyka KV, Hartung HP, Gold R. Regulation of Fas and FasL expression on rat Schwann cells. *Glia.* 2000 Jun;30(4):373-81.
50. Gold R, Hartung HP, Lassmann H. T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends Neurosci.* 1997 Sep;20(9):399-404.
51. Toyka KV, Gold R. The pathogenesis of CIDP: rationale for treatment with immunomodulatory agents. *Neurology.* 2003 Apr 1;60(8 Suppl 3):S2-7.
52. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, DiFranco D, Priori R, Conti F, Dianzani I, Valesini G, Merletti F, Dianzani U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood.* 2000 May 15;95(10):3176-82.
53. Comi C, Leone M, Bonisconi S, DeFranco S, Bottarel F, Mezzatesta C, Chiocchetti A, Perla F, Monaco F, Dianzani U. Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2000 Oct 10;55(7):921-7.
54. Vaishnav AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, Sitarz A, Zemel L, Chu JL, Elkon KB. The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations. *Arthritis Rheum.* 1999 Sep;42(9):1833-42.
55. Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Neurology.* 1991 May;41(5):617-8.
56. De Maria R, Testi R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today.* 1998 Mar;19(3):121-5.

Seminari

Anno 2003/04

30 gennaio 2004

Prof. Magnus INGELMAN-SUNDBERG

Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy

18 Febbraio 2004

BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE

10 marzo 2004

Prof. Guido Valesini

TNF, anti-TNF ed autoimmunità

31 Marzo 2004

Dr ANTONIA FOLLENZI

Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori
lentivirali

3 maggio 2004

Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT

"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS)
subtypes"

Alberto MARTINI

20 maggio 2004

Le artriti croniche del bambino

Antonio PUCCETTI

25 maggio 2004

Virus e malattie autoimmuni

28 maggio 2004

ANGIOLO BENEDETTI

IL RETICOLO ENDOPLASMATICO UN LABIRINTO METABOLICO

18 Febbraio 2004

BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE

14 giugno 2004

PROF. DAVID MURPHY

15 giugno 2004

BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS:
PRINCIPLES, PROSPECT AND PROBLEMS.

FUNCIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY.

29 giugno 2004

Prof. Emilio Hirsch

PI 3-KINASE γ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY
THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS

- 30 giugno 2004
Manlio FERRARINI
Meccanismi patogenetici della
Leucemia Linfatica Cronica
Rita Clementi
ALTERAZIONI DEL GENE DELLA PERFORINA NELLE PATOLOGIE
LINFOPROLIFERATIVE
- 30 gennaio 2004
Prof. Magnus INGELMAN-SUNDBERG
Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy
- 10 marzo 2004
Prof. Guido Valesini
TNF, anti-TNF ed autoimmunità
- 31 Marzo 2004
Dr ANTONIA FOLLENZI
Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso
di vettori lentivirali
- 3 maggio 2004
Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT
"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
(ALPS) subtypes"
Alberto MARTINI
- 20 maggio 2004
Le artriti croniche del bambino
Antonio PUCCETTI
- 25 maggio 2004
Virus e malattie autoimmuni
- 14 giugno 2004
PROF. DAVID MURPHY
BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS:
PRINCIPLES, PROSPECT AND PROBLEMS
- 29 giugno 2004
Prof. Emilio Hirsch
PI 3-KINASE □ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND
HYPERTROPHY THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT
FUNCTIONS
- 30 giugno 2004
Manlio FERRARINI
Meccanismi patogenetici della
Leucemia Linfatica Cronica

CONGRESSI

1° anno:

**XXXIV CONGRESSO DELLA SOCIETA' ITALIANA DI NEUROLOGIA. ROMA
25-29 SETTEMBRE 2003**

2° anno:

European Charcot Foundation Symposium, Lisbon, December 11-13, 2003.

**XXXV CONGRESSO DELLA SOCIETA' ITALIANA DI NEUROLOGIA.
GENOVA 25-29 SETTEMBRE 2004**

ABSTRACT

OSTEOPONTIN GENE HAPLOTYPES CORRELATE WITH MULTIPLE SCLEROSIS
DEVELOPMENT AND PROGRESSION. Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, et al.
European Charcot Foundation Symposium, Lisbon, December 11-13, 2003.

PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni " Peer Reviewed":

1° anno: Lombardi G, Miglio G, Canonico PL, Naldi P, **Comi C**, Monaco F. Abnormal response to glutamate of T lymphocytes from multiple sclerosis patients.

Neurosci Lett 2003; 340: 5-8.

2° anno: Osio M, Zampini L, Muscia F, Valsecchi L, **Comi C**, Cargnel A, Mariani C. Cutaneous silent period in Human-Immunodeficiency-Virus (HIV)-related peripheral neuropathy. J Peripher Nerv Syst. 2004 in press.