



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Neuroscienze – DNS

Direttore: Ch.mo Prof. Raffaele De Caro

Clinica Neurologica

Direttore: Ch.mo Prof. Maurizio Corbetta

TESI DI LAUREA:

**L'EFFETTO DI NATALIZUMAB SULLA RETINA DEI PAZIENTI AFFETTI
DA SCLEROSI MULTIPLA**

Relatore: Ch.mo Prof. Paolo Gallo

Correlatrice: Dott. Marco Puthenparampil

Laureanda: Elisa Basili

Anno Accademico 2021/2022

*“[...] Oh la piagata primavera
è pur festa se raggela
in morte questa morte! Guarda ancora
in alto, Clizia, è la tua sorte, tu
che il non mutato amor mutata serbi,
fino a che il cieco sole che in te porti
si abbàcini nell’Altro e si distrugga
in Lui, per tutti. Forse le sirene, i rintocchi
che salutano i mostri nella sera
della loro tregenda, si confondono già
col suono che slegato dal cielo, scende, vince –
col respiro di un’alba che domani per tutti
si riaffacci, bianca ma senz’ali
di raccapriccio, ai greti arsi del sud...”*

E. Montale, La primavera hitleriana.

INDICE

Riassunto	1
Abstract	3
1 Introduzione	5
1.1 La Sclerosi Multipla	5
1.1.1 Epidemiologia	6
1.1.2 Eziopatogenesi	6
1.1.3 Presentazione clinica	13
1.1.4 Diagnosi	16
1.2 La via ottica nella Sclerosi Multipla.....	21
1.2.1 Anatomia della via ottica	21
1.2.2 La tomografia a coerenza ottica come strumento per indagare il coinvolgimento della via ottica nella SM.....	23
1.2.3 I foci iperriflettenti	32
1.3 Microglia	35
1.3.1 La microglia nella Sclerosi Multipla.....	36
1.4 Natalizumab.....	39
2 Scopo dello studio.....	45
3 Materiali e Metodi	47
3.1 Popolazione di studio	47
3.2 Protocollo di acquisizione delle immagini OCT	48
3.3 Foci iperriflettenti intraretinici (HRF).....	53
3.4 Analisi statistica	54
4 Risultati.....	55
4.1 Descrizione della popolazione di studio.....	55
4.2 Analisi dei parametri OCT	56
5 Discussione	67
6 Conclusioni	71
7 Bibliografia	73

Riassunto

Background: La retina e la via ottica rappresentano un modello ideale per lo studio della neurodegenerazione e dell'inflammatione nella sclerosi multipla (SM), grazie alla possibilità di accedervi facilmente mediante metodiche non invasive come la Tomografia a Coerenza Ottica (OCT). Tramite OCT è possibile analizzare gli strati retinici in vivo e, in particolare, pRNFL e GCIP sono considerati biomarkers di neurodegenerazione, mentre l'INL è considerato biomarker di inflammatione.

Le cellule della microglia, i macrofagi residenti del SNC, sembrano avere un ruolo patogenetico centrale nella SM, dimostrandosi associate alla presenza di attività clinica e radiologica della malattia. L'OCT consente di identificare nella retina interna i cosiddetti foci iperriflettenti (HRF), presumibilmente costituiti da aggregati di microglia attivata e proliferante.

Scopo dello studio: Il presente studio condotto in pazienti con indicazione all'avvio di terapia con Natalizumab si propone di: 1) caratterizzare le modifiche di volumi e spessori retinici nei pazienti con SM Relapsing-Remitting (SMRR), 2) esplorare l'origine e il significato degli HRF retinici.

Materiali e metodi: È stata studiata la retina di pazienti con SMRR, con e senza storia di neurite ottica, acquisendo scansioni OCT in corrispondenza dell'avvio di terapia con Natalizumab o entro un mese da esso (T1), successivamente a 2 o 3 mesi di distanza (T2) e, infine, 5 o 6 mesi dopo la prima infusione (T3); quando possibile, è stata acquisita un'ulteriore scansione a distanza di almeno 10 mesi dal basale (T4). Il protocollo OCT comprendeva: 1) scansione peripapillare circolare per lo studio del *Retinal Nerve Fiber Layer* (pRNFL); 2) scansione maculare volumetrica per l'analisi degli strati retinici interni, ovvero RNFL, *Ganglion cell Layer/Inner Plexiform Layer* (GCIP) e *Inner Nuclear Layer* (INL), ed esterni, ovvero *Outer Plexiform/Nuclear Layer* (OPNL). Abbiamo quindi analizzato i parametri OCT in associazione al comportamento degli HRF nel tempo di osservazione.

Risultati: Sono stati reclutati 29 pazienti (per un totale di 58 occhi analizzati) con diagnosi di SMRR (età media 29 ± 12 anni, mediana durata di malattia 1 mese (range IQ 3 mesi), mediana EDSS basale 1.0 con range 1.0-5.5). Sette/29 (24%) avevano avuto una NO monoculare, ventitre/29 (79.3%) erano al primo trattamento. I risultati ottenuti non hanno evidenziato significative variazioni in termini di volumi e spessori retinici tra T2 e T3 rispetto al basale, delineando una sostanziale stabilità. Parallelamente si è osservato un precoce aumento del numero dei foci iperriflettenti nei vari strati, con una tendenza alla significatività per gli HRF dell'INL ($p=0.053$).

Conclusioni: Il presente lavoro ha riscontrato, da un lato, una sostanziale stabilità per quanto riguarda gli spessori e i volumi retinici peripapillari e maculari nei pazienti in corso di terapia con Natalizumab, dall'altro, un sensibile aumento degli HRF negli strati retinici interni, e in particolare nell'INL, degli stessi pazienti. Quest'ultimo risultato necessita di ulteriori indagini volte a chiarire se l'attivazione/proliferazione della microglia retinica sia espressione di un processo pro- o anti-infiammatorio.

Abstract

Background: Retina and the optic pathway may represent an ideal model to study neurodegeneration and inflammation in multiple sclerosis (MS), given the fact that they can be easily assessed by using non-invasive methods such as Optical Coherence Tomography (OCT). Through OCT it is possible to evaluate retinal layers in vivo. In particular, pRNFL and GCIP are considered biomarkers of neurodegeneration, while INL is considered a biomarker of inflammation. Microglia, i.e. the resident macrophages of the CNS, appears to play a central role in MS pathogenesis, being associated with the presence of clinical and radiological disease activity. OCT makes it possible to identify the so-called hyper-reflective foci (HRF) in the internal retina, presumably consisting of aggregates of activated and proliferating microglia.

Aim of the study: This study recruited patients with the indication to initiate treatment with Natalizumab, aiming to: 1) characterize changes in retinal volumes and thickness in patients with Relapsing-Remitting MS (RRMS), 2) explore the origin and significance of retinal HRF.

Materials and methods: Retina of RRMS patients, with or without a positive history of optic neuritis, was studied by performing OCT within one month from the first Natalizumab infusion (T1), subsequently 2 or 3 months later (T2), and finally 5 or 6 months after the first infusion (T3). If possible, a further examination was performed at least 10 months after baseline (T4). The OCT protocol included: 1) circular peripapillary scan for the study of the Retinal Nerve Fiber Layer (pRNFL); 2) volumetric macular scan for the analysis of internal retinal layers, namely RNFL, Ganglion cell Layer/Inner Plexiform Layer (GCIP) and Inner Nuclear Layer (INL), and external ones, i.e. Outer Plexiform/Nuclear Layer (OPNL). OCT parameters were analyzed in association with HRF behavior through the observation period.

Results: 29 patients (for a total of 58 analyzed eyes) with RRMS diagnosis (mean age 29 ± 12 years, median duration of disease 1 month (IQ range 3 months), median baseline EDSS 1.0 with range 1.0-5.5) were recruited. Seven/29 (24%) had a

monocular NO and twenty-three/29 (79.3%) were naïve to the treatment. The results obtained did not show significant variations in terms of retinal volumes and thickness between T2 and T3 compared to baseline, showing overall stability.

At the same time, an early increase in hyper-reflective foci number in the different layers was observed, with a tendency to the statistical significance in INL HRF ($p = 0.053$).

Conclusions: This study demonstrates substantial stability as regards the thickness and volumes of the peripapillary and macular retina in patients treated with Natalizumab. Moreover, a significant increase in HRF number in the retinal layers, and in particular in the INL, has been found. The latter result requires further investigations to clarify whether the activation/proliferation of retinal microglia is the expression of a pro- or anti-inflammatory process.

1 Introduzione

1.1 La Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, demielinizzante e neurodegenerativa del sistema nervoso centrale. Si tratta di una patologia eterogenea, multifattoriale e immuno-mediata, caratterizzata dall'accumulo di lesioni demielinizzanti a carico di sostanza bianca e sostanza grigia di encefalo e midollo spinale¹.

Le manifestazioni cliniche e il decorso della Sclerosi Multipla sono ampiamente eterogenei. La maggior parte dei pazienti presenta un esordio acuto o subacuto caratterizzato da un evento neurologico focale a carico del nervo ottico (neurite ottica), del telencefalo (sindrome focale sovratentoriale), del tronco encefalico (Sindrome del Tronco Encefalico) o del midollo spinale (mielite incompleta). Generalmente si tratta di episodi caratterizzati dalla comparsa di deficit neurologici (noti anche come recidive) che durano giorni o settimane per poi regredire, e che caratterizzano appunto le fasi iniziali di malattia (la sindrome clinicamente isolata, CIS) e la SM recidivante-remittente (SMRR); nel tempo, lo sviluppo di deficit neurologici permanenti e la progressione della disabilità clinica possono diventare prominenti, determinando lo sviluppo di una forma di SM nota come SM secondaria progressiva (SPMS). È tuttavia doveroso specificare che vi è una minoranza di pazienti con un decorso progressivo della malattia fin dall'esordio che rientra in un'altra forma ancora di SM, definita primaria progressiva (SMPP)¹.

La SM è la malattia cronica del SNC a maggior prevalenza a livello globale, identificandosi come la principale causa di disabilità neurologica non traumatica nel giovane adulto²; ne consegue che i costi sociali ad essa associati siano elevati a causa della sua lunga durata, della precoce perdita di produttività, della necessità di assistenza nello svolgimento di attività della vita quotidiana e del ricorso a trattamenti immunomodulatori e all'assistenza sanitaria multidisciplinare³.

1.1.1 Epidemiologia

Al momento attuale si stima che le persone affette da SM nel mondo siano circa 2.3 milioni. L'incidenza è maggiore nel sesso femminile con un rapporto donne:uomini che da 2:1 è passato a 3:1 negli ultimi 50 anni. Vari studi epidemiologici effettuati in Italia stimano l'incidenza della malattia a circa 5.5 casi/100.000 abitanti-anno⁴, con un picco massimo di incidenza intorno ai 30 anni. Nello specifico, si calcola che il 75% degli esordi avvenga tra i 20 e i 40 anni⁵ e che il 3-5% dei casi sia diagnosticato in minori di 16 anni, mentre più rari sono i casi individuati al di sotto dei 10 anni o oltre i 65.

Degno di nota è il concetto di “*gradiente latitudinale*” per cui in molti studi è emerso che una latitudine più elevata sia correlata ad una maggiore prevalenza e incidenza di SM, principalmente in Nord Europa e Nord America^{6,7}. Tuttavia, recenti analisi hanno dimostrato l'aumento dell'incidenza nei paesi dell'area Mediterranea, mettendo in discussione questa storica associazione.

Fattori genetici, in particolare la distribuzione dell'aplotipo HLA-DRB1, potrebbero in parte spiegare il gradiente latitudinale, tuttavia si presume siano coinvolti anche fattori di rischio ambientali che variano con la latitudine, tra i quali i bassi livelli di vitamina D, l'esposizione al fumo di sigaretta, la dieta e gli inquinanti ambientali¹. Le disabilità causate dalla SM sono la principale causa diretta di morte in più del 50% dei pazienti, sebbene l'incidenza delle infezioni e del suicidio sia sostanzialmente più elevata rispetto a quella della popolazione generale. Si calcola che l'aspettativa di vita di questi pazienti sia ridotta di 7-14 anni, sebbene questa riduzione risulti meno evidente nelle stime più recenti⁸.

1.1.2 Eziopatogenesi

L'esatta eziopatogenesi della SM rimane ancora sfuggente, tuttavia si pensa che la malattia si manifesti in individui geneticamente suscettibili in cui entrano in gioco anche fattori di rischio ambientali.

Nonostante la SM non sia annoverata tra le patologie ereditarie, si riconosce una importante componente genetica nella sua eziologia, come evidenziato dal raggruppamento di individui affetti all'interno di alcune famiglie. In particolare, il rischio di SM tra i parenti di primo grado è di 10-50 volte superiore rispetto alla popolazione generale (rischio assoluto 2–5%); mentre il tasso di concordanza nei gemelli monozigoti raggiunge circa il 30%⁹.

Tra i fattori di rischio genetici, grazie ai vari studi di associazione sull'intero genoma (*genome wide association studies, GWAS*), si sono identificati più di 200 loci, di cui buona parte contenuti nella regione MHC/HLA, implicata nello sviluppo della risposta immunitaria. Tra questi, la variante allelica HLA-DRB1*15:01 risulta essere la più significativa, con un OR di circa 3; oltre ad essa, anche tra i loci extra-HLA associati alla SM si osserva la ricorrenza di geni coinvolti nella funzione immunitaria, come i recettori di IL-2 e IL-7, interferoni (IFNs) e TNFR1¹⁰.

Poiché sono state identificate mutazioni associate ad un aumentato rischio di SM solo in pochissimi geni con una chiara funzione nel sistema nervoso (ad esempio MANBA e GALC), possiamo dedurre che generalmente i fattori di rischio genetici di questa malattia non si sovrappongono con quelli di altre patologie neurodegenerative¹. Risulta di notevole importanza ricordare, infine, che la maggior parte delle associazioni mappa in regioni del genoma intrageniche o intergeniche e quindi non codificanti.

Tra i fattori ambientali, l'infezione con virus di Epstein-Barr (EBV) e la carenza di vitamina D sono state ampiamente studiate e fortemente associate al rischio di SM. In particolare, in una recente pubblicazione di Bjornevik et al.¹¹ è stata testata l'ipotesi della relazione causale tra SM e infezione da EBV in una coorte composta da oltre 10 milioni di giovani adulti militanti nell'esercito americano, 955 dei quali con diagnosi di SM ricevuta nel periodo di servizio. Il rischio di SM si è dimostrato aumentato di 32 volte a seguito dell'infezione da EBV, e non da altri virus con trasmissione analoga come il CMV. Inoltre, i livelli sierici della catena leggera dei neurofilamenti, un biomarcatore della degenerazione neuroassonale, sono risultati aumentati solo dopo la sierconversione di EBV, corroborando ancora una volta l'ipotesi per cui l'EBV sia il fattore di rischio principale per la SM. Si ribadisce, inoltre, come la SM sia prevalente nelle aree geografiche più lontane dall'equatore,

dove bassi livelli di vitamina D dovuti alla ridotta esposizione solare possono essere un fattore determinante una maggiore suscettibilità allo sviluppo di questa malattia. Diversi studi hanno suggerito che livelli più elevati di vitamina D potrebbero avere persino un possibile ruolo protettivo in alcune popolazioni di pazienti a rischio, senza contare il fatto che vi sono sempre maggiori prove a sostegno dell'ipotesi che livelli insufficienti di vitamina D rappresentino un fattore favorente la progressione della SM¹².

Anche il fumo di sigaretta è stato proposto come potenziale fattore di rischio ambientale, con diversi studi che riportano l'associazione tra fumo e rischio di sviluppo di malattia attiva (OR per lo sviluppo della SM è di circa 1.5 per i fumatori rispetto a non fumatori).

Non esiste una dieta specifica associata ad un aumento del rischio di SM. Il ruolo dei fattori dietetici, infatti, sembra essere complesso e legato all'influenza di molteplici nutrienti, tra cui vitamina A e D, sale, omega-3 e polifenolo, sulla regolazione immunitaria⁹.

IMMUNOPATOGENESI

Risulta ancora una questione aperta se la SM sia innescata in periferia o nel SNC. Nel modello di origine al di fuori del SNC, cellule T autoreattive (Th1, Th17) sono attivate a livello periferico ed entrano nel SNC attraverso la barriera ematoencefalica o i plessi corioidei, insieme a cellule B e monociti. Questa modalità di induzione della malattia viene utilizzata, a livello sperimentale (*Experimental Autoimmune Encephalitis, EAE*), per indurre in modelli animali una patologia infiammatoria del SNC inoculando linfociti T reattivi per antigeni target (come ad esempio MOG₃₅₋₅₅ e MBP₈₃₋₉₉). In alternativa, l'inoculazione di antigeni target (MOG, MBP, PLP) induce una reattività complessa diretta contro il SNC di questi animali, coinvolgente più sottopopolazioni T, nonché la produzione di autoanticorpi¹³.

In contrapposizione, il modello di origine interna al SNC, fa riferimento a eventi intrinseci al SNC che potrebbero innescare lo sviluppo della malattia, con l'infiltrazione di linfociti autoreattivi che si verifica come fenomeno secondario¹⁰. Non è chiaro quali potrebbero essere questi eventi intrinseci al SNC, sebbene i

meccanismi postulati includano la risposta infiammatoria a un'infezione virale del SNC ancora sconosciuta, o a processi che portano alla neurodegenerazione primaria, simili a quelli implicati nel morbo di Alzheimer o nel morbo di Parkinson¹⁹¹⁴. Anche in questo caso è possibile indurre una patologia autoimmune infiammatoria diretta controllo il SNC di modelli animali mediante infezione virale. Il danno tissutale nella SM deriva da un'interazione complessa e dinamica tra il sistema immunitario, la componente gliale (*oligodendrociti* che producono mielina e i loro precursori, la *microglia* e gli *astrociti*) e i neuroni¹⁵.

Il segno patologico di tutti i fenotipi della SM è rappresentato dalle *placche focali* (note anche come lesioni), ovvero aree di demielinizzazione localizzate tipicamente intorno alle venule postcapillari e caratterizzate dalla rottura della barriera ematoencefalica (BEE)¹. I meccanismi di danno della BEE non sono ancora del tutto chiari, ma sembrano essere legati ad effetti diretti di citochine e chemochine pro-infiammatorie (come TNF, IL-1 β e IL-6) prodotte da cellule residenti e cellule endoteliali, e all'effetto indiretto dipendente dalla produzione di chemochine e citochine da parte dei leucociti^{16,17}. La disregolazione della BEE aumenta la migrazione trans-endoteliale dei leucociti attivati, inclusi macrofagi, cellule T e cellule B, nel SNC, che porta a ulteriore infiammazione e demielinizzazione, seguita da perdita di oligodendrociti, gliosi reattiva e degenerazione neuroassonale^{18,19}.

Sul versante dei linfociti T, nelle lesioni associate a SM, sono stati descritti sia linfociti T helper (CD4+) che citotossici (CD8+): i CD4 sono più concentrati nella "cuffia" perivascolare, mentre i CD8 sono ampiamente distribuiti all'interno del parenchima²⁰. E' dimostrato che i farmaci che limitano l'accesso dei linfociti T al SNC possono ridurre o eliminare la comparsa di nuove lesioni. Tuttavia, è opportuno sottolineare che le cellule T reattive agli antigeni mielinici sono state osservate in proporzioni simili in individui con e senza SM, suggerendo che, oltre ad esse, anche altri fattori immunitari svolgano ruoli critici nello sviluppo della malattia. A causa del successo precoce degli anticorpi mirati alla riduzione delle cellule B nel limitare la formazione di nuove lesioni e l'attività clinica della malattia, si è rivolta maggiormente l'attenzione sul ruolo delle cellule B nella patogenesi della SM²¹. È noto da tempo che il liquido cerebrospinale della maggior parte delle

persone con SM ospiti anticorpi unici (*bande oligoclonali*) prodotti all'interno del SNC. Tuttavia, a causa della rapidità della risposta clinica all'esaurimento dei linfociti B (già a 8-12 settimane), ancor prima della riduzione delle immunoglobuline circolanti, sembra più probabile che le altre funzioni dei linfociti B, incluse la presentazione dell'antigene ai linfociti T helper e la produzione di citochine, siano più rilevanti nella perpetrazione del danno.

Anche le cellule del sistema immunitario innato sono particolarmente importanti nella patogenesi della SM²². I macrofagi circolanti nel sangue si infiltrano nelle lesioni attive della SM e rimuovono i detriti di mielina e i sottoprodotti infiammatori. La microglia, costituita dai fagociti endogeni primari del SNC, risulta abbondante nelle lesioni SM, ma rimane incerto se il suo ruolo sia patogenetico, protettivo, o entrambi²³. Una volta attivati, microglia e macrofagi sono patologicamente indistinguibili, ma i recenti progressi nell'utilizzo della tecnologia di espressione genica hanno aperto le porte a svelare i loro contributi separati, consentendo potenzialmente lo sviluppo di terapie mirate²⁴.

ASPETTI NEUROPATOLOGICI

A complicare ulteriormente la comprensione della patogenesi della SM è la varietà di tipi di lesione osservata nelle persone affette. Sebbene la localizzazione anatomica delle tipiche lesioni della sostanza bianca sia associata a manifestazioni cliniche specifiche della SM, il volume totale di queste lesioni è solo moderatamente correlato alla disabilità clinica generale e al deterioramento cognitivo riscontrato in questi pazienti^{25,26}. Questo aspetto può essere spiegato dal coinvolgimento di altri meccanismi fisiopatologici nello sviluppo del danno da parte della malattia, come l'insorgenza di lesioni della sostanza grigia e il danno al tessuto cerebrale apparentemente normale, che colpisce sia la sostanza grigia che la sostanza bianca (NAWM e NAGM)¹.

Mentre le lesioni della sostanza bianca (WMLs) possono essere classificate sulla base della loro attività immunologica²⁷⁻²⁹, le lesioni della sostanza grigia (GMLs) sono caratterizzate solo da una piccola infiltrazione di cellule immunitarie^{30,31}.

La posizione, le dimensioni e la forma delle WMLs variano tra i pazienti e sono stati descritti diversi modi per classificarle patologicamente. Il sistema di

stadiazione definito da Bø e Trapp distingue le lesioni in *attive*, *croniche attive* e *inattive*. Le lesioni *attive* sono lesioni ipercellulari caratterizzate da relativa conservazione assonale con massiccia infiltrazione di linfociti, cellule del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)-II+ e/o macrofagi carichi di mielina distribuiti uniformemente in tutta la lesione. Anche le lesioni *attive croniche* si presentano con relativa conservazione assonale, ma in questo caso i macrofagi carichi di mielina si accumulano ai bordi della lesione. Le lesioni *inattive*, invece, sono lesioni ipocellulari caratterizzate da una sostanziale perdita di assoni e oligodendrociti, astrogliosi e una minore infiltrazione di macrofagi/microglia e linfociti^{27-29,32}. A questo sistema di classificazione, infine, è possibile aggiungere un altro tipo di lesione, la lesione *preattiva*, caratterizzata da cluster di microglia senza demielinizzazione e senza infiltrazione di linfociti^{27,33-35}. Un ulteriore modo per caratterizzare le WMLs attive è in base ai loro profili patologici. In merito a ciò, sono stati descritti quattro pattern distinti di demielinizzazione: il *pattern I* è caratterizzato da infiltrazione di cellule T e demielinizzazione attiva con molta microglia attivata e macrofagi carichi di mielina in assenza di immunoglobuline (Ig) e deposizione di complemento; le lesioni del *pattern II*, quello più frequente, sono simili alle lesioni del pattern I, ma mostrano inoltre una deposizione di Ig e complemento; anche le lesioni di *pattern III* si presentano con caratteristiche analoghe a quelle di pattern I ma, in questo caso, vi è una chiara apoptosi degli oligodendrociti, con una perdita preferenziale della glicoproteina associata alla mielina (MAG); infine le lesioni di *pattern IV* sono estremamente rare e associate a morte non apoptotica di oligodendrociti in un sottile strato di sostanza bianca circondante la placca di demielinizzazione^{18,32}. Se questi diversi pattern rappresentino diversi sottotipi di WMLs, o diversi stadi all'interno della formazione di WMLs è ancora dibattuto^{32,36}.

Come già anticipato, per quanto le lesioni demielinizzanti siano più facilmente identificabili nella sostanza bianca, il solo coinvolgimento di questa non è sempre stato in grado di spiegare o predire la clinica e le osservazioni radiologiche nei pazienti³⁷. Questo paradosso clinico-radiologico è stato ampiamente risolto accumulando evidenze da studi istopatologici³⁸⁻⁴⁰ e di imaging ad alta risoluzione⁴¹⁻⁴⁵ che mostrano che anche la sostanza grigia è coinvolta nel processo

di demielinizzazione. Le GMLs possono verificarsi in varie regioni cerebrali di pazienti con SM, come la corteccia cerebrale, il talamo^{46,47}, l'ippocampo^{48,49}, il cervelletto^{46,50} e il midollo spinale⁴⁶. Finora sono stati descritti tre pattern patologici di lesioni della sostanza grigia, ma solo per quanto riguarda la demielinizzazione corticale³¹. Le lesioni di *tipo I* sono lesioni leucocorticali che includono sia la sostanza bianca sottocorticale che la corteccia; le lesioni di *tipo II* si trovano all'interno della corteccia senza estendersi alla superficie o alla sostanza bianca sottocorticale, e le lesioni di *tipo III* sono subpiali, e si estendono dalla superficie piale all'interno della corteccia stessa³¹. Bø et al. hanno aggiunto infine una quarta categoria di lesioni, ovvero le lesioni di *tipo IV*, che si estendono per tutto lo spessore della corteccia cerebrale senza intaccare la sostanza bianca⁵¹.

Oltre a queste lesioni focali osservate nei pazienti con SM, la sostanza bianca apparentemente normale (NAWM) mostra spesso segni di infiammazione diffusa e danno neuroassonale^{38,52}. Anomalie della NAWM sono state osservate nei pazienti con SMRR, ma sono più gravi in quelli con malattia progressiva e comprendono una ridotta densità delle fibre nervose dovuta alla degenerazione assonale e alla demielinizzazione, l'infiltrazione di piccole cellule rotonde (principalmente linfociti) e di macrofagi, l'attivazione diffusa della microglia e la gliosi³⁸.

È stato appurato che il fenomeno della rimielinizzazione può verificarsi nella SM⁵³⁻⁵⁵ ed è stato anche suggerito come meccanismo di recupero clinico dopo una ricaduta, a tal punto da considerarlo un potenziale obiettivo per future terapie⁵⁶. La rimielinizzazione dà origine alle cosiddette *placche d'ombra*, caratterizzate da una rimielinizzazione globale o a chiazze, da una netta demarcazione dalla NAWM circostante e da assoni con guaine mieliniche sottili e internodi accorciati^{53,54,57,58}. L'estensione della rimielinizzazione è molto eterogenea, sebbene generalmente limitata al bordo della lesione o a chiazze, ed è stata dimostrata in circa il 40-50% delle lesioni della sostanza bianca e in circa il 90% delle lesioni della sostanza grigia, seppure siano stati riportati valori diversi in alcuni studi effettuati in merito⁵³⁻⁵⁵. La variabilità nella rimielinizzazione dipende da diversi fattori, tra cui l'età dei pazienti, la durata della malattia, la posizione della lesione, la presenza di cellule progenitrici degli oligodendrociti e l'integrità assonale⁵⁹; una sostanziale rimielinizzazione si osserva frequentemente durante le prime fasi della SM e negli

individui più giovani, mentre è più scarsa o addirittura assente nella SMPP e nella SPMS⁶⁰.

1.1.3 Presentazione clinica

La presentazione clinica della SM è eterogenea e dipende dalla localizzazione delle lesioni demielinizzanti all'interno del SNC. Sebbene nessun riscontro clinico sia esclusivo della SM, alcuni sono altamente caratteristici della malattia.

La neurite ottica è il primo episodio neurologico in circa il 25% dei pazienti, senza contare che circa il 70% dei pazienti con SM presenta neurite ottica nel corso della malattia. Essa è caratterizzata da un calo del visus, con la percezione di vedere “appannato”, e spesso è preceduta da dolore retro o sovraorbitario, esacerbato dai movimenti oculari. Durante l'esame del fondo oculare mediante oftalmoscopia, la testa del nervo ottico appare normale se l'infiammazione è limitata alla porzione retrobulbare del nervo, oppure si può rilevare un edema del disco ottico, come accade in circa un terzo dei pazienti che presentano un'infiammazione della testa del nervo ottico (papillite o neurite ottica anteriore). I pazienti senza disturbi visivi, con sospetta SM, devono essere valutati per le manifestazioni più sottili di neurite ottica, come un difetto pupillare afferente o anomalie ai test paraclinici (ad esempio, potenziali evocati visivi, tomografia a coerenza ottica (OCT) o MRI)¹.

I sintomi sensoriali sono la prima manifestazione clinica in quasi il 43% dei pazienti con SM e sono causati principalmente da mielite o sindromi del tronco encefalico⁶¹. Essi includono parestesie, segno di Lhermitte⁶² (un sintomo transitorio descritto come una scossa elettrica che si irradia lungo la colonna vertebrale o negli arti con flessione del collo), alterazioni della pallestesia, della propriocezione o del dolore. Questi sintomi possono addirittura peggiorare temporaneamente con l'aumento della temperatura corporea (noto come fenomeno Uhthoff).

Le manifestazioni motorie sono i sintomi iniziali nel 30-40% dei pazienti e colpiscono quasi tutti i pazienti nel corso della malattia⁶³; sono caratterizzati da segni piramidali (come il segno di Babinski, riflessi più pronunciati e clono), paresi e spasticità.

I sintomi del tronco encefalico e del cervelletto coinvolgono fino al 70% dei pazienti con SM⁶³ ed includono compromissione dei movimenti oculari (come nistagmo, oscillopsia e diplopia), atassia, dismetria, eloquio disartrico, tremore intenzionale e disfagia. L'entità della disfunzione sessuale e sfinteriale spesso è parallela al grado di compromissione motoria degli arti inferiori, e di solito diventa permanente alla fine del decorso della malattia, colpendo dal 34% al 99% dei pazienti⁶⁴. Altri sintomi includono deterioramento cognitivo, fatica e disturbi del tono affettivo, o ancora disturbi del sonno, e tipicamente la prevalenza e la severità di tutte le manifestazioni cliniche sono maggiori nelle forme più aggressive di SM.

DECORSO CLINICO

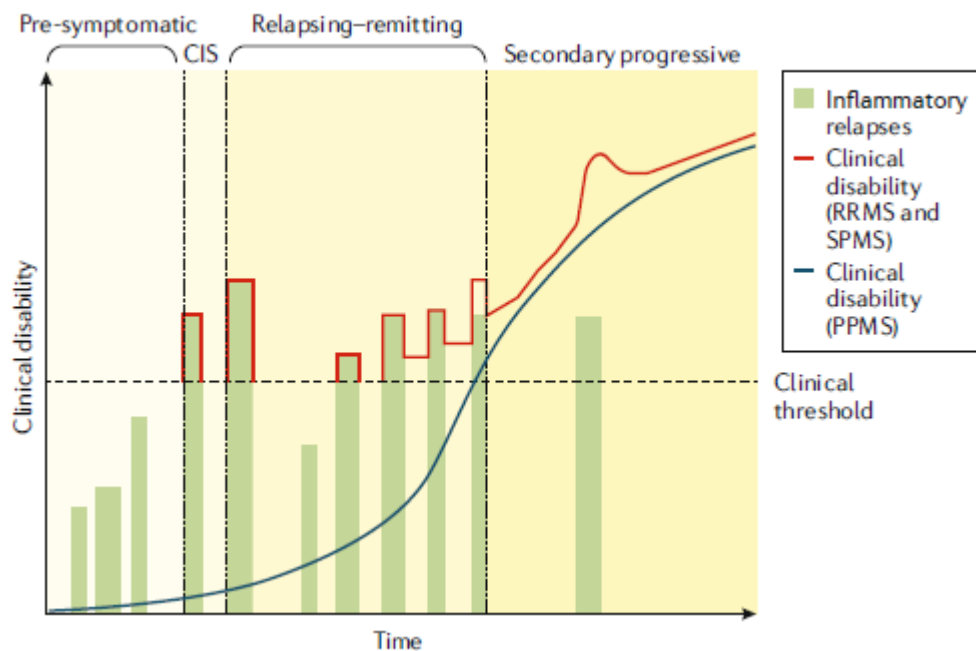


Figura 1. Decorso clinico della Sclerosi Multipla

Nel 1996 il National Multiple Sclerosis Society Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis ha definito quattro decorsi clinici della SM: SM Ricedivante-Remittente (SMRR), SM Secondaria Progressiva (SMSP), SM Primaria Progressiva (SMPP) e SM Progressiva Ricedivante (SMPR)⁶⁵. La SMRR riguarda circa l'85% dei pazienti ed è caratterizzata dal verificarsi di ricadute a intervalli irregolari con recupero neurologico completo o incompleto⁶⁶⁻⁶⁸; la

frequenza media delle ricadute è di circa 1,1 all'anno all'inizio, ma sembra diminuire con l'avanzare della malattia, con l'aumento della disfunzione neurologica e con l'età⁶⁹. La SMSP si sviluppa successivamente ad una iniziale forma recidivante-remittente (la conversione si verifica in circa il 2–3% dei pazienti all'anno⁶⁵) ed è caratterizzata da una disabilità progressiva e irreversibile che si manifesta indipendentemente dalla presenza di ricadute. Circa il 10-15% dei pazienti, invece, si presenta con SMPP, che è caratterizzata dalla progressione della malattia fin dall'esordio, con conseguenti deficit neurologici gradualmente, progressivi e permanenti^{65,70}. La SMPR è rara e si contraddistingue per la presenza di malattia progressiva sin dall'esordio, con recidive acute (con o senza pieno recupero clinico) e periodi di continua progressione tra le recidive⁶⁵. È stata proposta una revisione di questi fenotipi⁷¹ che include la sindrome clinicamente isolata (CIS), per indicare quei pazienti la cui prima presentazione clinica ha caratteristiche di demielinizzazione infiammatoria che potrebbero essere ascrivibili alla SM, ma che non soddisfano tutti i suoi criteri diagnostici. Inoltre ciascun sottotipo di malattia può essere definito come *attivo o non attivo* sulla base del verificarsi di recidive cliniche, o di nuove lesioni rilevate mediante risonanza magnetica. Si parla invece di malattia in fase di *progressione* in caso di accumulo di disabilità o presenza di deficit neurologici indipendenti dalle ricadute e in assenza di recupero. Infine, si parla di SM in fase di *peggioramento* nei casi caratterizzati da incremento di disabilità o da deficit neurologici secondari a una ricaduta nelle forme Relapsing-Remitting, o come ulteriore peggioramento della disabilità nelle forme progressive. In questa nuova classificazione non si parla più di variante Progressiva-Remittente ma di forma Primaria Progressiva con attività.

I fenotipi clinici di malattia possono essere ridefiniti quindi come:

- 1) CIS non attiva;
- 2) SMRR attiva o non attiva;
- 3) SM progressiva, comprendente sia il fenotipo primario progressivo sia la forma secondaria progressiva. Ciascun fenotipo può essere definito come attivo/non attivo, con o senza peggioramento.

Sono state proposte diverse scale qualitative e semiquantitative per classificare le manifestazioni cliniche della SM. Tra queste, l'Expanded Disability Status Scale

(EDSS)⁷² è la più utilizzata: L'EDSS è una scala che va da 0 (esame neurologico del tutto normale) a 10 (morte per SM) e fornisce 8 misurazioni di sottoscala (punteggi del sistema funzionale) che includono i principali domini funzionali affetti da SM, ovvero visivo, piramidale, cerebellare, tronco encefalico, sensoriale, sfinterico, cognitivo e deambulazione.

1.1.4 Diagnosi

La diagnosi di SM si basa su una combinazione di risultati clinici, imaging e dati di laboratorio, come enunciato dagli attuali criteri diagnostici, ovvero i Criteri di McDonald modificati del 2017 (*Figura 2*)⁷³. La diagnosi di SM è definita dalla dimostrazione della disseminazione delle lesioni nello spazio e nel tempo (*figura 3*).

La disseminazione nello spazio (DIS) si riferisce alla presenza di lesioni in distinte sedi anatomiche del SNC, tra cui quella infratentoriale, iuxtacorticale o corticale, periventricolare e del midollo spinale. Queste lesioni possono essere identificate attraverso la manifestazione di eventi clinici che coinvolgono diverse aree del SNC, attraverso lesioni multiple iperintense identificate alla risonanza magnetica in sequenze T2 (nello specifico le WMLs appaiono iperintense in T2 o FLAIR e iso/ipointense in T1, mentre l'individuazione delle GMLs può essere migliorata con l'uso di sequenze DIR), o entrambe.

La disseminazione nel tempo (DIT) si riferisce allo sviluppo di nuove lesioni nel tempo. La risonanza magnetica può dimostrare la DIT attraverso la presenza simultanea di lesioni che captano gadolinio (acute) e non (croniche), attraverso l'identificazione di una nuova lesione in T2 alla risonanza magnetica di follow-up, o ancora da molteplici attacchi clinici distinti. La crescente applicazione della risonanza magnetica ha inoltre notevolmente aumentato l'identificazione di individui asintomatici con anomalie nella risonanza magnetica cerebrale suggestive di SM, rientranti nel quadro della cosiddetta sindrome radiologicamente isolata (RIS)⁷⁴. Fino al 34% dei pazienti con RIS ha un attacco clinico entro 5 anni ed è emerso che il sesso maschile, l'età più giovane e la presenza di lesioni del midollo

spinale aumentano il rischio di avere un primo evento clinico⁷⁵. Nei pazienti con un singolo attacco clinico, anche la presenza di bande oligoclonali specifiche del liquido cerebrospinale può soddisfare il criterio della disseminazione nel tempo, poiché indica la sintesi di anticorpi intratecali ed è associata ad un rischio maggiore di un secondo attacco⁷³.

Oltre a soddisfare i criteri precedentemente enunciati, devono essere escluse diagnosi alternative, comprese altre condizioni infiammatorie del SNC, come il disturbo dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD), caratterizzato da un coinvolgimento midollare longitudinale oltre i 3 metameri, condizioni infiammatorie sistemiche (neurosarcoidosi), disturbi ereditari (malattia di Fabry), infezioni (neurosifilide), disturbi tossici e nutrizionali (carenza di B12), tumori (glioblastoma) e malattie vascolari (infarto cerebrale)⁷⁶. Infine, altra importante diagnosi differenziale, soprattutto nei soggetti più giovani, è quella con l'Encefalomyelite Acuta Disseminata (ADEM), spesso associata a febbre e preceduta da malattie esantematiche, infettive o vaccinazioni.

No. of clinical attacks	No. of MRI lesions with objective clinical evidence ^a	Additional data needed for diagnosis of multiple sclerosis
Relapsing-remitting multiple sclerosis		
≥2	≥2	None ^b
≥2	1 ^c	None
≥2	1	DIS demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS Site or by MRI
1	≥2	DIT demonstrated by additional clinical attack, MRI, or CSF-specific oligoclonal bands
1	1	DIS demonstrated by additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI and DIT demonstrated by an additional clinical attack or by MRI or demonstration of CSF-specific oligoclonal bands
Primary progressive multiple sclerosis		
Required: 1 year of disability progression (retrospectively or prospectively determined) independent of clinical relapse Plus 2 of the following: 1 or more T2-hyperintense lesions characteristic of multiple sclerosis in 1 or more of the following brain regions: periventricular, cortical or juxtacortical, or infratentorial; 2 or more T2-hyperintense lesions in the spinal cord; presence of CSF-specific oligoclonal bands		

Abbreviations: CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DIS, dissemination in space; DIT, dissemination in time; MRI, magnetic resonance imaging.

^a Adapted with permission from *Lancet Neurology*.¹⁴

^b Although no MRI is required for the diagnosis, an MRI scan of the brain should be obtained in all patients with a suspected diagnosis of MS unless not possible.

^c One lesion as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomical location.

Figura 2. Criteri di McDonald 2017 per la diagnosi di Sclerosi Multipla

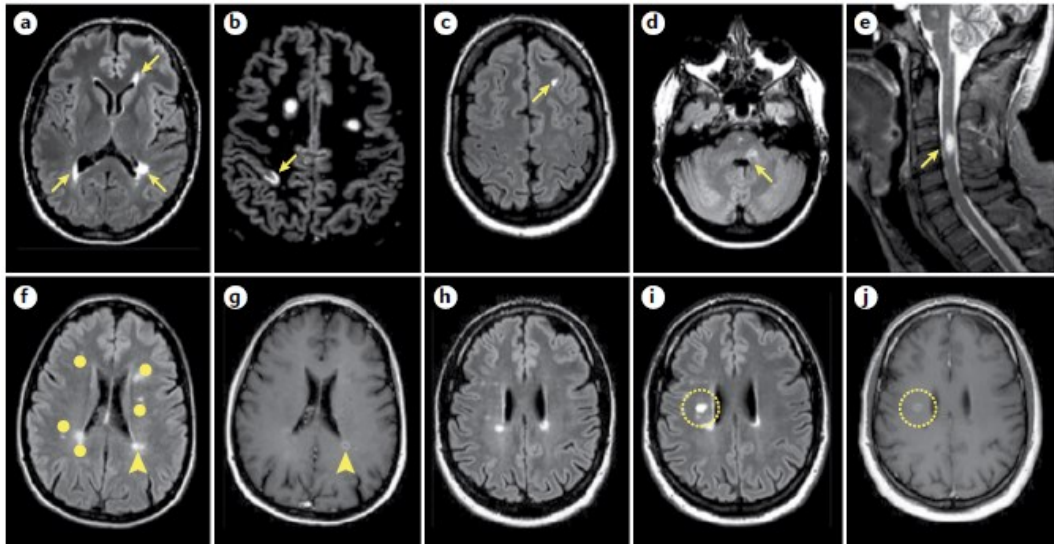


Figura 3. a–e | La disseminazione nello spazio (DIS) può essere dimostrata da una o più lesioni iperintense in T2 in due o più aree delle quattro tipiche del sistema nervoso centrale (frecce), con la rimozione della distinzione tra lesioni sintomatiche e asintomatiche. Le lesioni periventricolari sono mostrate nella sezione *a*. Lesioni corticali o iuxtacorticali sono mostrate nelle sezioni *b* e *c*. Le lesioni infratentoriali sono mostrate nella sezione *d*. Una lesione del midollo spinale è mostrata nella sezione *e*. *f–j* | La disseminazione nel tempo (DIT) può essere dimostrata alla MRI dalla presenza simultanea di lesioni captanti gadolinio e non (sezioni *f*, *g*) in qualsiasi momento e con la rimozione della distinzione tra lesioni sintomatiche e asintomatiche, oppure da una nuova lesione iperintensa in T2 e/o lesione captante gadolinio alla risonanza magnetica di follow-up rispetto al basale (sezioni *h–j*). Diverse lesioni della sostanza bianca sono visibili in sequenza FLAIR (sezione *f*): una di queste mostra la captazione di gadolinio (freccia) nella sequenza post-contrasto (sezione *g*). Rispetto alla sequenza FLAIR basale (sezione *h*), una nuova lesione T2 iperintensa e captante il gadolinio (cerchiata) è visibile nella FLAIR di follow-up (sezione *i*) e nelle sequenze post-contrasto (sezione *j*). Adattato da *Filippi et al. Primer 2018*.

1.2 La via ottica nella Sclerosi Multipla

1.2.1 Anatomia della via ottica

L'occhio è composto da una serie di mezzi diottrici (cornea, cristallino, vitreo) la cui funzione è quella di convogliare le immagini sulla retina. Nella retina, che si trova nella porzione più esterna, sono contenuti due tipi di *fotorecettori*, i *coni* (visione fotopica) e i *bastoncelli* (visione scotopica), i quali contraggono sinapsi con le *cellule bipolari*, a loro volta connesse con le *cellule multipolari* o *gangliari*, i cui assoni convergono prima nello strato di fibre nervose retiniche intraoculari e poi nel nervo ottico. In particolare la retina è composta da dieci strati (*Figura 4*) che, procedendo dall'esterno verso l'interno, si susseguono in questo ordine:

1. Epitelio pigmentato retinico (RPE);
2. Strato dei fotorecettori: coni e bastoncelli (PR);
3. Membrana limitante esterna (ELM);
4. Strato nucleare esterno (ONL);
5. Strato plessiforme esterno (OPL);
6. Strato nucleare interno (INL);
7. Strato plessiforme interno (IPL);
8. Strato delle cellule multipolari o gangliari (GCL);
9. Strato delle fibre nervose retiniche (RNFL);
10. Membrana limitante interna (ILM).

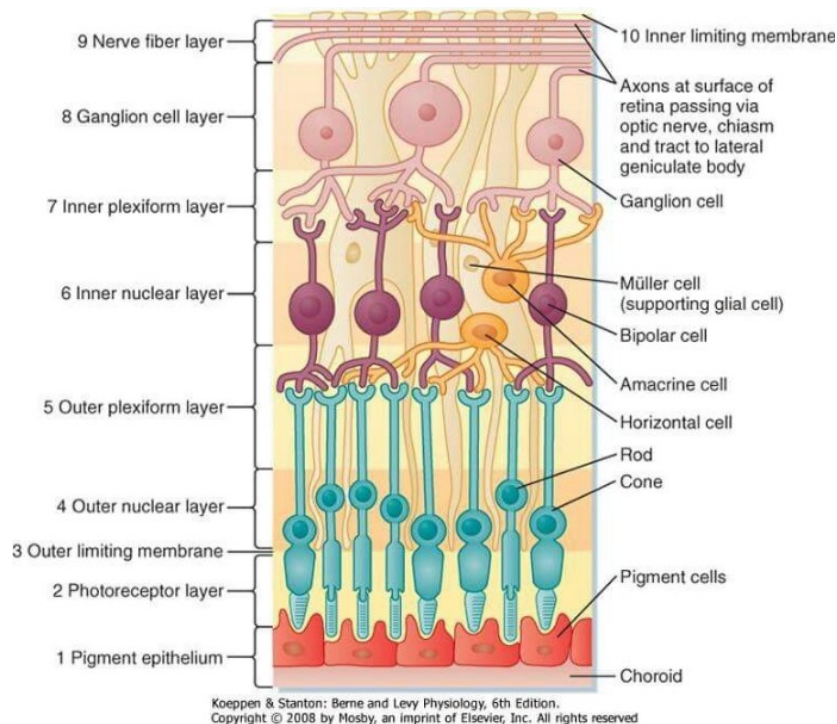


Figura 4. Strati retinici e loro componenti

I fotorecettori rappresentano il primo neurone della via ottica e il loro soma risiede nello strato nucleare esterno; a livello dello strato plessiforme esterno, invece, si trovano le sinapsi tra i fotorecettori e le cellule bipolari, mentre le cellule orizzontali sono deputate alle connessioni trasversali intrastrato. Le sinapsi tra le cellule bipolari e le cellule gangliari si localizzano nello strato plessiforme interno, dove, con funzione analoga alle cellule orizzontali, si trovano le cellule amacrine.

Come precedentemente anticipato, gli assoni delle cellule gangliari entrano nello strato delle fibre nervose della retina e vanno a costituire, in corrispondenza della papilla ottica, il *nervo ottico*, le cui fibre presentano una precisa organizzazione topografica. La porzione centrale è infatti occupata dal fascio papillo-maculare (PMB), un contingente di assoni che origina dall'area della visione distinta, la macula lutea appunto, caratterizzata da una elevata densità di coni e da un'escavazione centrale, o fovea, dove invece sono localizzati esclusivamente coni, prendendo il nome di area di massima acuità visiva. Qui, INL e IPL sono assenti mentre il GCL e il RNFL sono di spessore minimo, cosicché la luce abbia un accesso diretto. Gli assoni delle cellule gangliari di ciascun occhio si uniscono quindi per formare il tratto intraorbitario del nervo ottico, ma solo una volta attraversata la lamina cribrosa acquisiscono la guaina mielinica e, attraverso il

forame ottico, giungono a livello intracranico. In prossimità del margine anteriore della sella turcica, ciascun nervo ottico confluisce in una struttura denominata *chiasma ottico*, con incrocio delle fibre provenienti dai quadranti nasali della retina omolaterale; queste, affiancandosi a quelle temporali del nervo controlaterale, vanno a costituire il *tratto ottico*, una benderella nastriforme di sostanza bianca che origina dalle due estremità del margine posteriore del chiasma per dirigersi ad uno specifico nucleo talamico, il *corpo genicolato laterale (CGL)*. Solamente un contingente minoritario di fibre, anziché terminare a livello del CGL, afferisce al nucleo pretettale del mesencefalo, situato anteriormente al tubercolo quadrigemello superiore, costituendo il centro cruciale per l'espletamento del riflesso fotomotore.

Nel corpo genicolato laterale, invece, i neuroni che ricevono le afferenze terminali delle fibre del tratto ottico danno origine ad assoni mielinizzati che, assemblandosi, costituiscono la *radiazione ottica del Gratiolet*; essa raggiunge, attraverso la sostanza bianca dei centri semiovali, il polo posteriore dei lobi occipitali, dove termina a livello dell'area corticale visiva primaria, area 17 secondo Brodmann, corrispondente alla corteccia che riveste i due labbri, superiore e inferiore, delimitanti la scissura calcarina.

1.2.2 La tomografia a coerenza ottica come strumento per indagare il coinvolgimento della via ottica nella SM

La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una tecnica di imaging non invasiva che utilizza la luce del vicino infrarosso per generare immagini ad alta risoluzione, trasversali o tridimensionali, di tessuti come la retina (*Figura 5*).

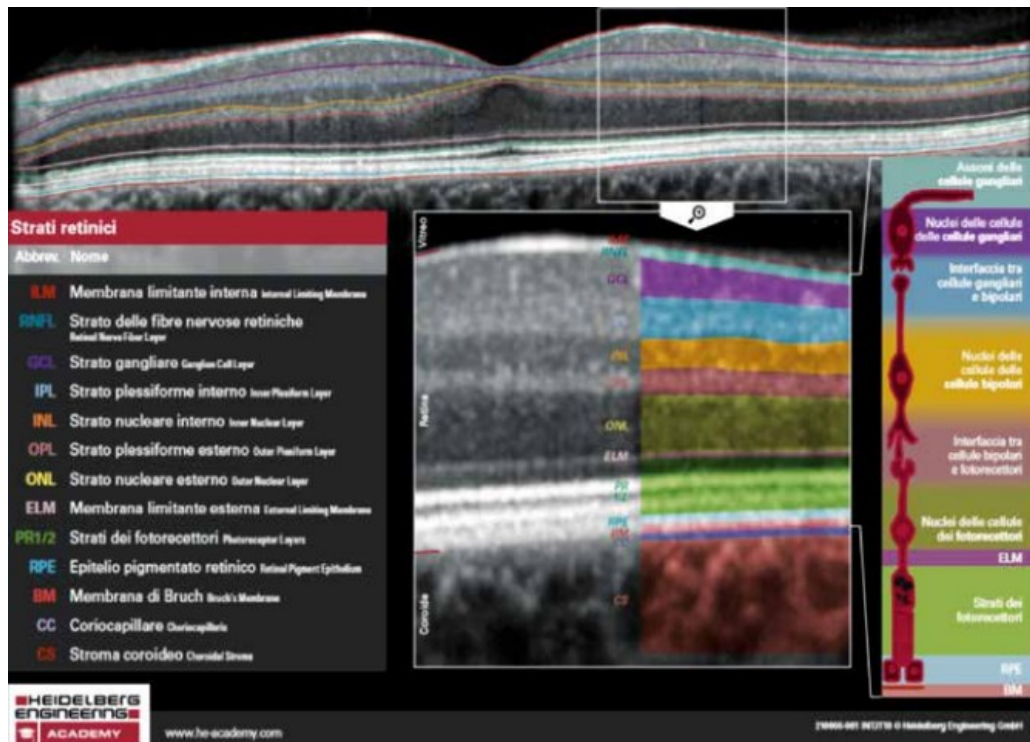


Figura 5. Scansione OCT centrata sulla fovea e ingrandimento che illustra la riproduzione dei dieci strati retinici. Adattato da SPECTRALIS®HRA+OCT, manuale d'uso. (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany).

Dal momento che la retina, embriologicamente parlando, può essere considerata correlata allo sviluppo del cervello⁷⁷, e che il nervo ottico si presenta costituito da assoni di cellule gangliari, microglia, oligodendrociti e astrociti, in modo analogo alla sostanza bianca del cervello⁷⁸, potendo quindi essere considerato a tutti gli effetti un'estroflessione del SNC, entrambe queste strutture sono bersaglio dei meccanismi patogenetici alla base della SM⁷⁹.

Da quando Parisi et al.⁸⁰ descrissero per la prima volta l'assottigliamento del pRNFL (RNFL peripapillare) nei pazienti con SM utilizzando il time-domain OCT di terza generazione (TD-OCT), sono stati fatti dei progressi tecnologici che hanno permesso di ottenere un miglioramento della risoluzione dell'immagine, una migliore riproducibilità e una maggiore rapidità nell'acquisizione della stessa^{81,82}. L'attuale OCT spectral-domain di quarta generazione (SD-OCT) rende immagini di 3–5 μm che facilitano l'applicazione di tecniche di segmentazione con le quali è possibile la quantificazione dei singoli strati retinici all'interno della macula^{83,84}.

La retina fornisce quindi una valida opportunità per lo studio dei meccanismi di danno della SM, in particolare relativamente alla degenerazione assonale e neuronale, grazie alla possibilità di accedervi facilmente mediante metodiche di

imaging non invasive e al fatto che all'interno dei suoi strati, assoni (RNFL) e neuroni (ad es. GCL) siano ampiamente rappresentati. In aggiunta, si ipotizza che, all'interno del nervo ottico, la transezione assonale infiammatoria acuta e/o la perdita del supporto trofico, insieme alla disfunzione mitocondriale e allo squilibrio ionico dovuto a demielinizzazione o lesione assonale cronica, provochino una *degenerazione retrograda* delle fibre costituenti^{79,85,86} e, poiché queste fibre derivano dall'RNFL, a sua volta in continuità con il GCL, si ritiene che questa degenerazione retrograda sia alla base dell'atrofia osservata a livello del RNFL e del GCL nella SM, come dimostrato dagli esami istopatologici e in-vivo dall'OCT^{79,85-88}.

E'opportuno aggiungere che, il documentato riscontro di atrofia degli strati retinici interni anche in pazienti che non avevano anamnesi positiva per neurite ottica, ha portato alcuni Autori ad ipotizzare anche l'esistenza della *degenerazione assonale retrograda trans-sinaptica*, per cui persino un danno a carico della via ottica posteriore (dal corpo genicolato laterale alla corteccia visiva occipitale) si tradurrebbe in atrofia retinica (*figura 6*); viceversa anche un danno della via ottica anteriore si rifletterebbe in atrofia delle strutture visive posteriori⁸⁹.

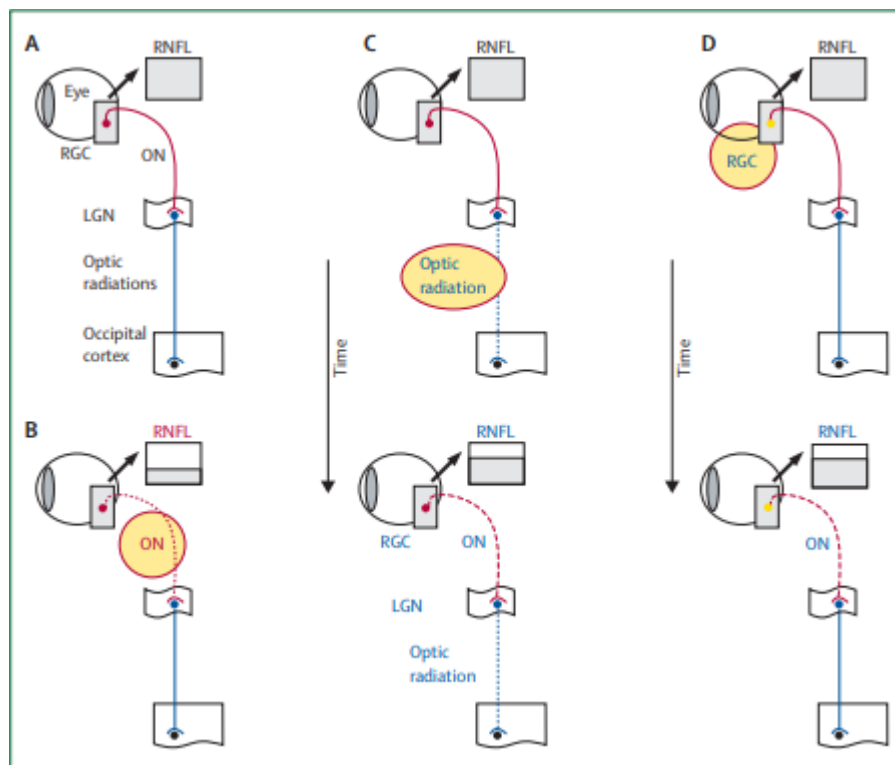


Figura 6. Un modello delle possibili correlazioni tra RNFL e SM. (A) Uno schema semplificato della via ottica umana. (B) Nella SM, la neurite ottica provoca direttamente una perdita assonale acuta a carico del nervo

ottico (linea tratteggiata rossa), portando all'assottigliamento del RNFL. (C) Le lesioni all'interno delle radiazioni ottiche (linea tratteggiata blu) associate a SM non provocano immediatamente un assottigliamento del RNFL, bensì ne causano una riduzione dello spessore in cronico, attraverso un meccanismo neurodegenerativo trans-sinaptico passante per il corpo genicolato laterale (LGN). Con il tempo, la degenerazione assonale trans-sinaptica provoca una modesta perdita assonale a livello del nervo ottico (linea tratteggiata rossa), e una lieve riduzione del RNFL (riquadro grigio). (D) La progressiva perdita di RGCs (punto giallo) è probabilmente il risultato di cambiamenti cronici nelle stesse vie ottiche anteriori nella SM e provoca una moderata riduzione del RNFL (riquadro grigio). Si noti che (C) e (D) si verificano entrambi in assenza di neurite ottica. Adattato da Petzold A et al., Lancet Neurol 2010.

Fino ad oggi l'OCT si è concentrato in particolar modo su due aree all'interno della retina: la macula e la regione peripapillare (dove l'assottigliamento del RNFL viene misurato circonferenzialmente attorno alla testa del nervo ottico).

Poiché il pRNFL contiene assoni non mielinizzati delle cellule gangliari retiniche (RGC), una riduzione del suo spessore molto probabilmente riflette l'assottigliamento o la perdita assonale, piuttosto che la demielinizzazione, rendendolo quindi un marker ideale di danno assonale^{90,91}. pRNFL, volume maculare totale (TMV) e, più recentemente, GCIP (risultato della misura combinata di GCL e IPL, difficili da distinguere singolarmente all'OCT), insieme allo strato nucleare interno (INL), sembrano essere gli strati retinici più studiati in merito alla Sclerosi Multipla.

Dal momento che si presume che le riduzioni a carico del GCIP riflettano principalmente l'assottigliamento del GCL e quindi l'atrofia dei corpi cellulari delle RGC, il suo spessore è utilizzato come biomarker di neurodegenerazione all'interno della retina^{91,92}. L'INL dal canto suo è costituito da cellule amacrine, bipolari e orizzontali, nonché dai corpi cellulari delle cellule di Müller, la cellula gliale più abbondante della retina⁹³. Negli ultimi anni, inoltre, è stato proposto dai ricercatori come marker di infiammazione nella SM^{91,94}. Si può dunque affermare che, insieme, la scansione dell'anello peripapillare e la scansione del volume maculare consentono una panoramica completa della retina e della malattia retinica⁹⁵.

La misura combinata del GCL e dell'IPL ha dimostrato affidabilità, riproducibilità e una relazione struttura-funzione (con funzione visiva e disabilità) superiori rispetto alle misure convenzionali dello spessore del pRNFL nella SM⁹⁶. L'assottigliamento del GCIP rispecchia ciò che avviene nell'intero cervello e, in particolare, l'atrofizzazione della materia grigia nel tempo⁹⁷. Esso è noto verificarsi anche in pazienti che sviluppano nuove lesioni in T2 e lesioni captanti contrasto alla risonanza magnetica (MRI) di follow-up, nonché ricadute cliniche e

progressione della disabilità, soprattutto nelle prime fasi di malattia^{87,97}. Non sorprende perciò che diversi studi abbiano attestato la correlazione tra le misure del GCIP e del pRNFL e i punteggi relativi all'acuità visiva, sia ad alto che a basso contrasto (HCVA e LCVA)^{88,98-100}. E' stato appurato che in circa un terzo dei pazienti con iniziale neurite ottica, l'infiammazione acuta è presente anche nella retina attorno al disco ottico, come evidenziato da un aumento precoce dello spessore del pRNFL, molto probabilmente indice dell'edema infiammatorio, che quindi può mascherare un concomitante assottigliamento dovuto alla degenerazione retrograda^{85,101}. Due importanti studi prospettici longitudinali hanno riscontrato un progressivo declino dello spessore del pRNFL nell'arco dei 12 mesi successivi la neurite ottica, con la maggior parte della riduzione che si verifica entro i primi 3 mesi dall'esordio e colpisce prevalentemente il settore temporale e il fascio papillo-maculare (PMB)^{102,103}. Risultati simili sono stati trovati per lo spessore maculare del GCIP che, a differenza del pRNFL, generalmente non risulta contaminato dall'edema infiammatorio, tanto che la neurodegenerazione è rilevabile già 1 mese dopo l'insorgenza della neurite ottica¹⁰³. Il tasso di atrofia diminuisce in caso di durata maggiore della malattia e ciò è indicativo dell'insorgere di un effetto plateau¹⁰⁴. La neurite ottica sembra interessare anche gli strati retinici più profondi, vale a dire l'INL, l'OPL, l'ONL e il complesso dei fotorecettori, suggerendo la coesistenza delle alterazioni trans-sinaptiche. Questi strati mostrano un ispessimento piuttosto che un assottigliamento, e ciò può essere spiegato come risultato dell'infiammazione associata¹⁰⁵.

Sempre per quanto riguarda gli strati retinici più profondi, l'aumento dello spessore dell'INL al basale, soprattutto nella forma di SM recidivante-remittente, ha dimostrato di essere in grado di predire la progressione della disabilità, le ricadute cliniche e la comparsa di nuove lesioni durante il follow-up^{84,106}. L'edema maculare microcistico (MMO) è caratterizzato dall'individuazione di aree simil cistiche iporiflettenti prevalentemente nel contesto dell'INL ed è stato osservato in circa il 5% degli occhi dei pazienti affetti da SM. A questo proposito è stato appurato, inoltre, come la presenza di MMO sia associata a punteggi peggiori di disabilità visiva e globale^{84,107}. Il meccanismo responsabile dell'ispessimento dell'INL e

quindi dell'origine del MMO rimane ancora non chiarito, anche se sono state proposte diverse ipotesi¹⁰⁸ (figura 7).

Abegg et al.¹⁰⁹ hanno sottolineato che il MMO può essere causato da una degenerazione assonale retrograda a seguito di qualsiasi tipo di lesione nella via ottica anteriore, proponendo l'espressione "*maculopatia retrograda*" per descrivere questo fenomeno. Allo stesso tempo Balk et al.¹¹⁰ hanno anche dimostrato che il MMO non è specifico per SM, suggerendo che un ruolo rilevante potrebbe essere ricoperto dalle cellule di Müller e dalla loro ridotta capacità di mantenere l'omeostasi del fluido retinico. Le cellule di Müller sono cellule gliali retiniche che si distribuiscono dalla ILM alla ELM e svolgono la funzione di mantenimento dell'omeostasi neurochimica e acquosa, di supporto dell'attività nervosa e di regolazione dell'integrità della barriera emato-retinica.

I cambiamenti in volume dell'INL, quindi, potrebbero essere spiegati postulando l'esistenza di un sistema glinfatico retinico analogo a quello encefalico. Questa ipotesi, inoltre, risulta coerente con la scoperta che il volume dell'INL può essere ridotto dall'acetazolamide, sostanza in grado di migliorare la funzione di pompaggio dell'acqua delle cellule di Müller¹¹¹.

Tuttavia, è stato anche suggerito che il MMO non derivi né da causa infiammatoria (probabilmente in relazione con la periflebite retinica) né da degenerazione retrograda trans-sinaptica¹¹²: un'ipotesi alternativa implica che l'atrofia dell'INL possa causare una trazione a livello dell'interfaccia vitreoretinica dovuta al fatto che corpo vitreo e macula rimangono strettamente adesi¹¹³.

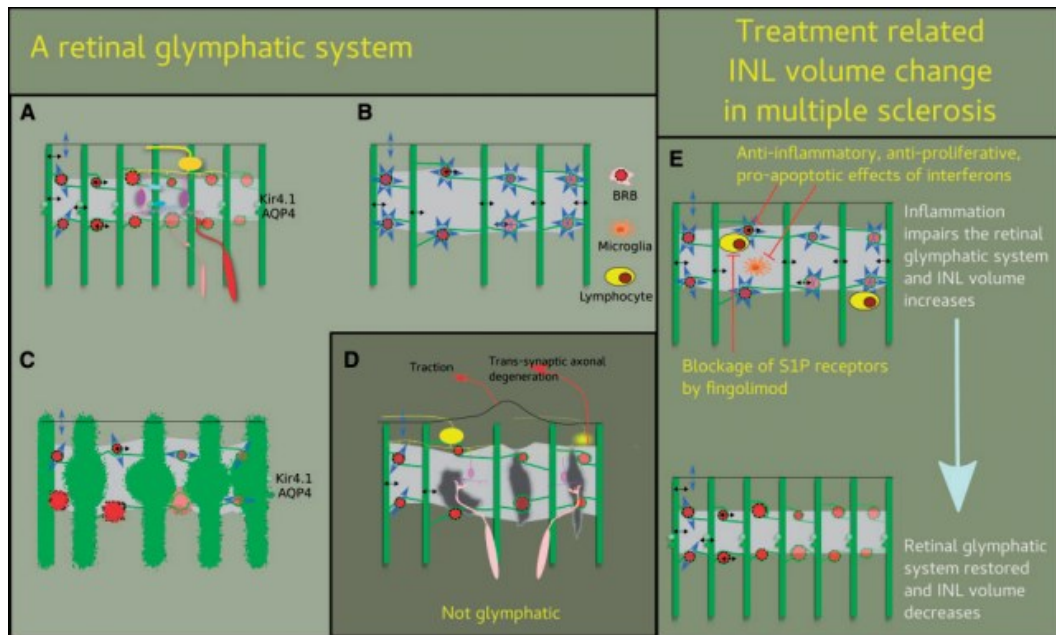


Figura 7. (A) Le cellule di Müller sono mostrate in verde mentre i canali dell'acqua (AQP4) e del potassio (Kir 4.1) sono rappresentati da linee tratteggiate nere e da cerchi verdi sparsi sulla membrana delle cellule di Müller. Le cellule bipolari dell'INL (riquadro grigio) sono mostrate in viola, i coni in rosso e i bastoncelli in rosa. Le cellule orizzontali (blu scuro) e amacrine (azzurro) contribuiscono alla rete neuronale dell'INL. La cellula gangliare retinica (gialla) estende il suo assone in quello che può essere visto come RNFL tramite OCT. Il plesso capillare superficiale e profondo (cerchi rossi) si localizzano ai margini superiore e inferiore dell'INL, mentre le frecce azzurre rappresentano il movimento dei fluidi dai capillari. In condizioni normali sia i capillari che le cellule di Müller possono assorbire il liquido interstiziale mantenendo l'omeostasi (doppie frecce nere). (B) L'infiammazione aumenta lo stravasamento di fluido dai vasi sanguigni retinici e verosimilmente causa un danno alla barriera emato-retinica con ulteriore stravasamento di agenti osmotici che, aumentando la pressione oncologica nello spazio extracellulare, determinano un transitorio aumento di volume dell'INL. L'attivazione della microglia e l'infiltrazione dei linfociti B possono contribuire all'edema rendendo più difficile per le cellule di Müller mantenere l'omeostasi. (C) Occorre considerare anche la possibilità di patologia primitiva delle cellule di Müller o dei capillari retinici che potrebbe compromettere l'assorbimento del liquido interstiziale e il tamponamento degli agenti osmotici. (D) Altre ipotesi eziopatogenetiche vedono coinvolti meccanismi non correlati al sistema glinfatico retinico, in particolare la degenerazione assonale retrograda e la trazione meccanica dell'INL da parte degli strati maculari interni. (E) Illustrazione dell'effetto della terapia immunomodulante (interferoni e fingolimod) sull'INL come evidenziato da Knier et al⁹⁴: al basale, i pazienti con SM hanno evidenza di attività infiammatoria con il volume dell'INL aumentato; il trattamento con fingolimod, un potente modulatore dei recettori della sfingosina-1-fosfato (S1P), e l'effetto antinfiammatorio multilivello degli interferoni, riducono la risposta infiammatoria sistemica anche nella retina, consentendo al sistema glinfatico retinico di recuperare la sua funzionalità e di conseguenza portando ad una riduzione del volume dell'INL. Adattato da Petzold et al, Brain 2016.

Infine, ulteriori studi hanno identificato un fenotipo della SM contraddistinto da un prevalente assottigliamento maculare (MTP), con la riduzione di INL e/o ONL e la relativa conservazione degli strati retinici più interni (pRNFL e GCIP). Questi reperti sono considerati non attribuibili alla degenerazione retrograda, bensì sono stati interpretati come evidenza di una malattia retinica primitiva. In particolare, tramite elettroretinografia (ERG) e OCT, è stata recentemente dimostrata una disfunzione delle cellule bipolari e dei fotorecettori (situati rispettivamente nell'INL e nell'ONL) in assenza di corrispondenti cambiamenti strutturali e indipendentemente dalla neurite ottica^{114,115}. Questi risultati supportano quindi

l'idea di anomalie retiniche primarie in quei pazienti che, generalmente, risultano affetti da forme più severe di Sclerosi Multipla¹¹⁶.

RILEVANZA CLINICA DEI REPERTI OCT NEI PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA

Al fine di convalidare l'utilità dell'OCT come strumento clinico e di ricerca nella Sclerosi Multipla, le implicazioni dei cambiamenti strutturali della retina discussi in precedenza sono di fondamentale importanza. C'è una significativa quantità di evidenze che dimostrano che i risultati dell'OCT siano associati sia alla disabilità visiva che a quella generale, oltre che all'attività di malattia e, sempre più, alla risposta al trattamento^{94,99,117}. In primo luogo, è stato dimostrato che le misure delle prestazioni visive, inclusa l'acuità visiva, la visione dei colori e la campimetria, sono correlate con gli spessori del pRNFL e, ancor più fortemente, con lo spessore del GCIP maculare^{96,99,118-120}. In particolare, è stato dimostrato che la LCVA (Low Contrast Vision Acuity) è fortemente correlata ai risultati dell'OCT ed è, con ogni probabilità, la misura più attendibile per definire la disfunzione visiva a seguito di neurite ottica¹²¹. Inoltre, uno studio con pazienti con neurite ottica ha dimostrato che le variazioni dello spessore di GCIP e pRNFL entro il primo mese dall'esordio della neurite ottica potrebbero predire il recupero visivo misurato tramite i parametri di LCVA e visione dei colori al sesto mese¹²². Per di più è stato riscontrato che il recupero visivo dopo la neurite ottica tende ad essere migliore nelle donne rispetto agli uomini, con la possibilità che sia associato anche ai livelli sierici di vitamina D^{102,123}.

Nella Sclerosi Multipla è stata osservata una relazione significativa tra parametri OCT e test elettrofisiologici come i Potenziali Evocati Visivi (PEV) e l'Elettroretinografia (ERG)¹²⁴, eseguiti al fine di quantificare rispettivamente la risposta corticale e retinica a precisi stimoli visivi¹²⁵.

L'Expanded Disability Status Scale (EDSS), ampiamente utilizzata per valutare la disabilità correlata alla Sclerosi Multipla, conferisce notevole importanza alla disabilità motoria e ai problemi della marcia, riservando ai deficit funzionali visivi una rilevanza minore⁷². Nonostante ciò, studi su pazienti con SM senza precedente neurite ottica hanno sottolineato che un valore dello spessore di pRNFL al di sotto

di una certa soglia (che varia in base al dispositivo OCT), misurato in un dato momento della malattia, può essere considerato predittivo di una progressione della disabilità più grave (misurata tramite EDSS) rispetto a quei pazienti con uno spessore maggiore di pRNFL¹¹⁷. Inoltre, è stata trovata una forte relazione anche tra deterioramento cognitivo e atrofia del pRNFL e del GCIP maculare, con conseguente associata riduzione della qualità della vita^{126,127}.

Analogamente è stato suggerito che un aumento dello spessore dell'INL, con o senza MMO visibile, può riflettere l'attività infiammatoria della SM. I pazienti con SMRR, che hanno poi avuto ricadute o comparsa di nuove lesioni durante un periodo di follow-up di 3 anni, avevano spessori di INL al basale più elevati rispetto ai pazienti che non sono andati incontro a recidive⁸⁴. Knier et al. hanno inoltre recentemente riportato che i pazienti rispondenti alle terapie immunomodulanti mostrano una normalizzazione dello spessore dell'INL, segno della riduzione dell'attività infiammatoria; questo spiega il notevole interesse acquisito dall'INL come possibile biomarcatore di risposta al trattamento⁹⁴.

Risultati successivi dello stesso centro mostrano una forte associazione tra il volume dell'INL e le caratteristiche delle risonanze di follow-up¹⁰⁰, fornendo ulteriori prove dell'importanza emergente dell'INL nella SM.

Nonostante il ruolo centrale ricoperto dalla MRI nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti, si è consapevoli del suo costo in termini di macchinari e tempo richiesto. In quanto strumento sensibile, accurato, rapido ed economico, l'OCT fornirebbe quindi un eccellente complemento alla risonanza magnetica per il monitoraggio dell'integrità del SNC nei pazienti con Sclerosi Multipla.

Poiché il danno assonale e neuronale irreversibile può verificarsi sin dalle prime fasi della malattia, la diagnosi precoce e l'avvio del trattamento più adeguato sono una priorità assoluta¹²⁸. A questo proposito l'OCT, essendosi dimostrato in grado di rilevare i cambiamenti retinici presenti nei pazienti CIS che presentano un primo evento clinico indicativo di SM¹²⁹, rappresenta un valido e rapido strumento per l'inquadramento dei pazienti a rischio, in grado di influenzare il processo decisionale clinico¹³⁰.

1.2.3 I foci iperriflettenti

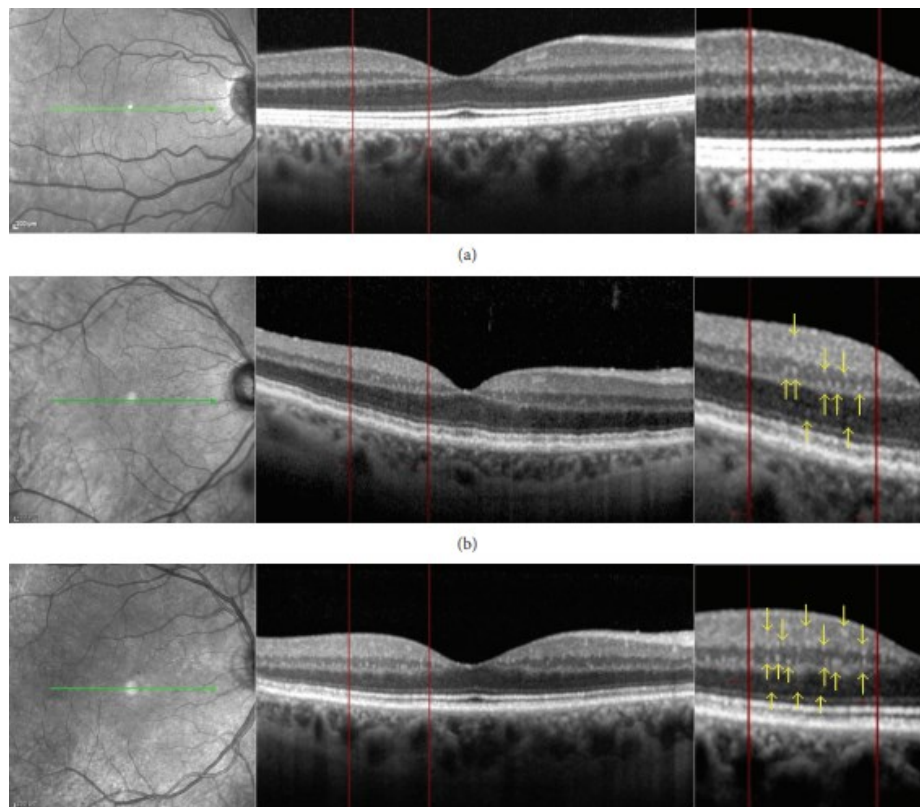


Figura 8. SD-OCT. Scansioni lineari della macula in (a) soggetto normale, (b) paziente diabetico senza retinopatia e (c) soggetto diabetico con una moderata retinopatia diabetica non proliferativa con HRF. Le frecce gialle indicano gli HRF visti mediante magnificazione dell'immagine. Adattato da Vujosevic et al., Journal of Diabetes research, 2013.

L'avvento della tomografia a coerenza ottica (OCT) ha cambiato radicalmente la comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base della malattia retinica, permettendo l'individuazione di nuove alterazioni strutturali in vivo¹³¹. Il termine "foci iperriflettenti (HRF – *hyperreflective foci*)" è stato coniato per descrivere ciascuna lesione iperriflettente, di aspetto focale o punteggiato, visualizzata attraverso OCT in qualsiasi strato retinico¹³². E' opportuno specificare, tuttavia, che il significato fisiopatologico degli HRF rimane incerto, oscillando dallo stravasamento di lipidi nell'edema maculare diabetico (DMO – *diabetic macular oedema*)¹³², alla migrazione delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE), ai macrofagi/microglia nella degenerazione maculare età correlata (AMD – *age-related macular disease*)¹³³⁻¹³⁵ e alle cellule fotorecetttrici degenerate¹³⁶. La presenza degli HRF ha dimostrato di avere implicazioni prognostiche e cliniche in diverse malattie della retina¹³⁷⁻¹⁴², influenzando anche la valutazione della risposta al trattamento nel caso del DMO^{143,144}. In particolare, è stato ipotizzato che gli HRF

rappresentino le cellule microgliali in grado di rispondere a specifici criteri morfometrici, e la loro caratterizzazione ha migliorato il riconoscimento di una componente infiammatoria preponderante che guida la gestione e la risposta al trattamento nel DMO¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Al di là del ruolo degli HRF come biomarcatori nel DMO, il loro riconoscimento e la loro valutazione in vari altri disturbi della retina potrebbero portare a un cambiamento nella gestione, nel trattamento e nella prognosi di queste patologie.

La presenza degli HRF nel DMO è stata descritta per la prima volta da Bolz et al.¹³² come punti iperriflettenti distribuiti su tutti gli strati retinici, e caratterizzati come depositi proteici e/o stravasi lipidici, precursori di essudati duri, che tendevano a riassorbirsi insieme al liquido intraretinico dopo il trattamento laser^{132,149,150}. Un'altra teoria ipotizzava, invece, che gli HRF fossero macrofagi carichi di lipidi che migravano negli spazi cistoidi come conseguenza della rottura della barriera emato-retinica (BER)^{151,152}. E' noto, tuttavia, che la proliferazione delle cellule gliali rappresenta una delle principali alterazioni della retinopatia diabetica e che il ruolo della microglia è essenziale per mantenere l'omeostasi retinica e la risposta infiammatoria¹⁵³. Questo trova riscontro nel fatto che, ad oggi, una delle ipotesi più accreditate suggerisce appunto che gli HRF con specifiche caratteristiche morfologiche siano composti da cluster di microglia attivata e proliferante. Infatti, negli occhi dei pazienti diabetici, gli HRF si osservano inizialmente nella retina interna, dove risiede la microglia¹⁴⁵, e, successivamente allo sviluppo della malattia retinica e dell'edema maculare diabetico, essi aumentano di numero e si diffondono verso gli strati retinici più esterni, imitando così l'attivazione microgliale e la sua analogo migrazione dalla retina interna a quella esterna, come descritto negli studi istopatologici¹⁵⁴.

È interessante notare come Lee et al.¹⁵⁵ abbiano altresì dimostrato che la citochina proinfiammatoria CD14 espressa da microglia, monociti e macrofagi sia correlata agli HRF nella retina interna e all'edema diffuso; tramite un modello di topi diabetici non obesi è stato possibile dimostrare, infatti, come le citochine proinfiammatorie abbiano un effetto inducente sia sugli HRF retinici e vitrei che sulle cellule della microglia upregolandole¹⁵⁶. I parametri per distinguere gli HRF infiammatori dagli altri sottotipi di materiale iperriflettente (cioè essudati retinici,

emorragie, piuttosto che microaneurismi) per mezzo dell'OCT includono la posizione nella retina interna, le dimensioni $\leq 30 \mu\text{m}$, l'assenza di ombre posteriori e una riflettività simile a quella dell'RNFL^{145,157,158}.

Khanifar et al. descrissero per la prima volta gli HRF nella degenerazione maculare età-correlata (AMD) nel 2008¹⁵⁹, analizzando in aggiunta l'ultrastruttura dei drusen tramite Spectral-domain OCT (SD-OCT). Si credeva che gli HRF rappresentassero cellule dell'epitelio pigmentato retinico migranti anteriormente e possibili fotorecettori disaggregati, come supportato dalle immagini¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Tuttavia, risultando l'iperpigmentazione non rilevabile in tutti i casi¹⁵⁹, si sono aperte ipotesi alternative circa un'origine non RPE dei foci. Nello specifico, si è fatta largo l'idea che i foci rappresentassero cellule microgliali migranti dagli strati retinici interni a quelli esterni, come emerso poi anche da alcuni studi istopatologici effettuati¹⁶². È risaputo che le cellule microgliali retiniche sono il primo tipo di cellule del sistema immunitario nella retina in grado di rispondere ad un insulto tissutale, alterando il loro stato di attivazione, acquisendo le capacità di migrazione e proliferazione e secernendo mediatori infiammatori e agenti neurotrofici¹⁶³. La dislocazione della microglia nella retina più esterna, tipica dell'età avanzata, determina alterate interazioni cellulari che concorrono all'insorgenza e alla progressione della AMD e corrobora l'ipotesi che gli HRF non siano altro che cellule microgliali attivate in grado di contribuire ulteriormente alla neurodegenerazione retinica¹⁶⁴.

Il ruolo degli HRF è stato inoltre studiato in altre malattie degenerative della retina, come la retinite pigmentosa (RP), che ha rivelato la presenza di HRF con distribuzione topografica specifica in associazione con la progressione della malattia. La distribuzione, principalmente concentrata su regioni di interruzione dei fotorecettori, è risultata associata all'infiammazione intraoculare, suggellando l'ipotesi che si tratti di RPE o di migrazione microgliale in risposta alla degenerazione dei fotorecettori¹⁶⁵.

1.3 Microglia

Le cellule microgliali giungono nel SNC durante lo sviluppo embrionale e si ritiene derivino da precursori mieloidi nel sacco vitellino, distinguendole dai macrofagi derivanti dai monociti¹⁶⁶. Esse svolgono un ruolo cruciale nel perfezionamento delle reti sinaptiche attraverso la regolazione del “*pruning*” (noto anche come potatura sinaptica) e della plasticità sinaptica, la fagocitosi delle cellule apoptotiche e la modulazione della neurogenesi tramite secrezione di fattori di crescita¹⁶⁷⁻¹⁷¹. In passato la microglia, in condizioni basali, veniva descritta come caratterizzata da sottili prolungamenti cellulari in uno stato di riposo (“*resting state*”)¹⁶⁶. Tuttavia, oggi questa dicitura non è più utilizzata poiché si è scoperto che in realtà queste cellule presentano prolungamenti mobili in grado di esaminare continuamente il microambiente del SNC, rispondendo rapidamente ai segni di sofferenza neuronale¹⁷². Quando “attivata” in caso di danno o malattia, la morfologia della microglia cambia, assumendo il tipico aspetto ameboide di un macrofago, anche se non è possibile affidarsi solo a questo aspetto per definirne l’attivazione^{166,173}. Sono stati esplorati vari marcatori di superficie cellulare per differenziare la microglia dai macrofagi e per identificare la microglia nello stato omeostatico, tra questi, la proteina transmembrana 119 (TMEM119) e il recettore purinergico P2Y12 sembrano essere i più affidabili per definire la microglia in condizioni patologiche^{174,175}. La precedente dicotomia tra microglia proinfiammatoria (M1) e antinfiammatoria (M2) non è più considerata valida poiché ci sono molteplici evidenze a favore dell’ipotesi che i fenotipi microgliali siano transitori e vadano incontro ad un’evoluzione temporale e spaziale^{166,173,176}. È stato inoltre scoperto un nuovo fenotipo, chiamato “dark microglia”, che potrebbe svolgere un ruolo nel rimodellamento patologico dei circuiti neuronali¹⁷⁷.

Si è osservato nel tempo un crescente coinvolgimento della microglia nelle malattie neurodegenerative, tra queste ricordiamo il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la sclerosi multipla¹⁷⁸⁻¹⁸². A proposito della SM è stato recentemente scoperto che i geni di suscettibilità sono più frequentemente associati alla funzione della microglia che ai neuroni o agli

astrociti¹⁸³ e che quindi la microglia possa essere posta al centro della patogenesi di questa malattia.

1.3.1 La microglia nella Sclerosi Multipla

Diversi studi suggeriscono che la microglia sia ampiamente attivata nella Sclerosi Multipla, sia nella sostanza bianca che nella sostanza grigia, e non solo nelle lesioni infiammatorie focali, ma anche nelle cosiddette NAWM e NAGM^{30,40,184,185} (figura 9). In effetti, si ritiene che la microglia attivata svolga un ruolo fondamentale nell'infiammazione del SNC, orchestrando un complesso intreccio di modificazioni locali che coinvolge tutte le cellule immunitarie infiltranti e le cellule gliali circostanti. Le numerose funzioni svolte includono la presentazione dell'antigene ai linfociti T, il rilascio di citochine proinfiammatorie nelle lesioni attive, l'aumento dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)-II, l'attivazione dei linfociti T e l'induzione della proliferazione degli astrociti¹⁸⁶. Inoltre, si è visto che le citochine rilasciate dalle cellule microgliali localmente possono indurre vari cambiamenti neuronali, compreso l'aumento dell'espressione dell'MHC-I e il danno cellulare indotto dallo stress ossidativo. Tutte queste modifiche rimodellano il tessuto cerebrale creando un ambiente fertile per l'attività proinfiammatoria di cellule B e T autoreattive¹⁸⁷.

In modelli sperimentali di encefalomielite autoimmune (EAE), è stato dimostrato come la paralisi microgliale ritardi l'insorgenza di EAE e riduca la gravità clinica¹⁸⁸. Oltre al ruolo svolto dalla microglia nella formazione di lesioni infiammatorie, essa si è visto essere implicata nell'eliminazione dei detriti mielinici e nell'induzione della rimielinizzazione, deponendo a favore di un cambiamento in uno stato "alternativamente attivato" o antinfiammatorio¹⁸⁹. Recenti osservazioni in vivo hanno rivelato l'implicazione delle cellule microgliali nelle lesioni della sostanza grigia¹⁹⁰ e nel passaggio della SM alla fase progressiva, in particolare nella lenta espansione delle lesioni croniche, suggerendo un loro ruolo chiave nella cosiddetta progressione della disabilità silente^{191,192}.

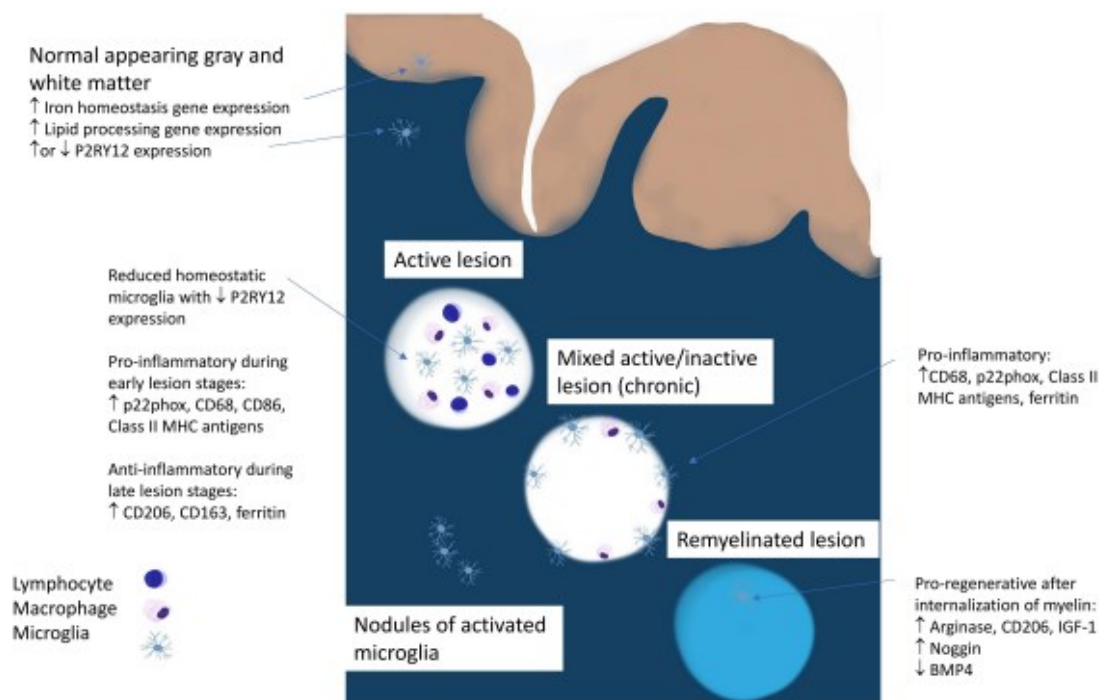


Figura 9. Ruolo della microglia nella SM

FOCI IPERRIFLETTENTI E MICROGLIA NELLA SCLEROSI MULTIPLA

Come già ribadito, la retina può essere considerata il sito ideale del SNC per lo studio del danno neurodegenerativo indotto da infiammazione¹⁹³, e l'OCT un valido strumento per la sua implementazione. Il danno subclinico a carico della retina è stato ipotizzato come causato dalla microglia attivata e la microglia retinica, visualizzata all'OCT come foci iperriflettenti (HRF) dislocati nella retina interna, si è dimostrata essere associata alla presenza di attività clinica o radiologica della malattia¹⁹⁴.

Recentemente in uno studio è stato descritto come pazienti con SMRR in fase precoce e attiva all'esordio clinico presentavano un numero significativamente maggiore di HRF nella retina interna rispetto ai controlli sani¹⁹⁴. Dallo stesso studio, inoltre, è emerso come nei pazienti all'esordio clinico e senza storia di NO, la presenza di un aumentato numero di HRF a fronte della presenza di spessori retinici normali e dell'assenza di altri segni di patologia locale, possa indicare come, presumibilmente, l'attivazione microgliale preceda qualsiasi processo neurodegenerativo nella retina.

A questa e ad altre conclusioni è giunto anche uno studio di Pengo et al.¹⁹⁵ effettuato su pazienti con SMRR in cui è stato dimostrato che il numero degli HRF si associa al volume dell'INL, confermando ulteriormente la loro patogenesi infiammatoria (come focolai di microglia attivata); sempre nella stessa occasione è emersa inoltre una forte associazione tra gli HRF nell'INL e la patologia corticale, suggerendo che la retina e la sostanza grigia potrebbero condividere meccanismi immunopatogenetici comuni. Grazie ai 43 mesi di follow-up in cui sono stati seguiti i suddetti pazienti è stato possibile infine desumere come il conteggio degli HRF al basale sia in grado di predire gli eventi infiammatori successivi.

In aggiunta a quanto detto, Puthenparampil et al.¹⁹⁶ hanno condotto uno studio con lo scopo di investigare la possibile correlazione tra gli HRF e un'ampia gamma di citochine solubili infiammatorie (incluse citochine correlate a monociti, microglia, granulociti e linfociti) nel liquido cerebrospinale di pazienti con SMRR all'esordio clinico e non ancora trattati con farmaci immunomodulanti. I risultati ottenuti hanno permesso di avvalorare ancora una volta l'ipotesi che gli HRF possano essere costituiti, almeno in parte, da microglia attivata e proliferante aggiungendo che le diverse concentrazioni di citochine/chemochine derivate da macrofagi/microglia indicano fortemente che questi fattori pro-infiammatori possono essere prodotti anche nella retina, spiegando così i cambiamenti morfologici qui osservati.

Gli HRF retinici sembrano configurarsi quindi come dei promettenti biomarcatori candidabili per chiarire in vivo i meccanismi alla base dell'attivazione e della proliferazione microgliale nei disturbi infiammatori e neurodegenerativi del cervello.

1.4 Natalizumab

Natalizumab (*Tysabri*® Biogen, Cambridge, MA, USA) è il primo anticorpo monoclonale IgG4 umanizzato ad essere stato approvato per il trattamento della Sclerosi Multipla Relapsing-Remitting; esso è in grado di riconoscere la catena $\alpha 4$ (CD49d) dell'antigene VLA4 (*Very Late Antigen 4* espresso dai linfociti T), una componente dell'integrina $\alpha 4\beta 1$ e dell'integrina $\alpha 4\beta 7$, ed impedirne il legame con VCAM-1, presente sulla membrana cellulare dell'endotelio vascolare nella barriera emato-encefalica. Questo anticorpo rappresenta il risultato clinico del lavoro pionieristico di Yednok et al., i quali dimostrarono il ruolo di questa molecola di adesione nell'interazione dei leucociti con l'endotelio cerebrale infiammato, provando che l'iniezione di un anticorpo monoclonale anti- $\alpha 4$ era in grado di prevenire l'EAE in un modello di ratto¹⁹⁷.

L'efficacia di Natalizumab (NTZ) nel trattamento della SMRR è stata valutata in particolare in due studi randomizzati e controllati. Nello studio AFFIRM¹⁹⁸, 942 pazienti sono stati randomizzati a ricevere 300 mg di Natalizumab in monoterapia o placebo facendo emergere come il braccio trattato abbia mostrato una riduzione statisticamente significativa del tasso di recidiva annualizzato rispetto al placebo (0.26 vs 0.81). Nello studio SENTINEL¹⁹⁹, invece, 1171 pazienti con SMRR con attività di malattia nonostante il trattamento con IFN β 1a, sono stati randomizzati a ricevere Natalizumab 300 mg ev o placebo come terapia aggiuntiva all'IFN. La terapia di associazione (Natalizumab più IFN β 1a) ha mostrato una riduzione statisticamente significativa del 54% del tasso annualizzato di recidive e una riduzione del rischio di progressione prolungata della disabilità dopo due anni. Dati osservazionali a lungo termine hanno inoltre dimostrato che Natalizumab è più efficace rispetto ad altre “*Disease Modifying Therapies*” (DMT)^{200,201}. Tuttavia, nonostante la nota efficacia nel ridurre l'attività di malattia, il vero fattore limitante l'utilizzo di Natalizumab è il rischio di sviluppare *leucoencefalopatia multifocale progressiva* (PML), un'encefalite potenzialmente fatale, causata dalla riattivazione del *Polyomavirus umano JC* (JCV). Il JCV è presente in circa il 60% della popolazione generale come infezione latente o asintomatica, tuttavia, poiché il Natalizumab impedisce l'ingresso di linfociti in grado di contrastare l'infezione nel

SNC, questo trattamento espone ad un rischio non trascurabile di contrarre suddetta malattia. I diversi fattori correlati allo sviluppo di PML sono quindi il precedente trattamento immunosoppressivo effettuato, la durata del trattamento con Natalizumab e l'esposizione a JCV (evidenziato dall'indice anticorpale anti-JCV). Il rischio complessivo di PML associato a trattamento con Natalizumab è di circa 4.22:1000 e il test per la presenza di anticorpi JCV viene effettuato ad intervalli di 6 mesi durante la terapia. In caso di sieropositività (cioè un indice anticorpale JCV > 0.9), la terapia con NTZ dovrebbe essere interrotta, in particolare dopo i primi due anni di terapia. Un'alternativa al passaggio ad un'altra terapia è l'estensione dell'intervallo di somministrazione, con l'attivazione del cosiddetto protocollo “*extended interval dosing*”, associato a un ridotto rischio di PML²⁰². Dato il rischio di PML, Natalizumab è quindi annoverato tra i trattamenti di seconda linea, ma può essere utilizzato come trattamento di prima linea in caso di insorgenza di SMRR grave ad evoluzione rapida, definita da due o più recidive disabilitanti in un anno e con una o più lesioni captanti contrasto alla RM, o da un aumento significativo del carico lesionale in T2 rispetto ad una precedente RM. Natalizumab viene somministrato per infusione endovenosa in quantità di 300 mg ogni quattro settimane dopo essersi assicurati che la conta dei leucociti e dei neutrofili sia nella norma e che eventuali altri immunomodulatori siano stati sospesi almeno un mese prima. Anticorpi neutralizzanti contro NTZ si sviluppano in circa il 6% dei pazienti, portando in questi casi ad una scarsa risposta al trattamento²⁰³. Natalizumab è controindicato nei pazienti con immunità cellulo-mediata compromessa e la sua interruzione è stata associata alla riattivazione e all'attività di rebound della SM²⁰⁴⁻²⁰⁷, richiedendo perciò un attento monitoraggio dopo la sospensione ed un'eventuale imbricazione con un'altra DMT.

EFFETTO DI NATALIZUMAB SUI REPERTI PATOLOGICI ASSOCIATI A SCLEROSI MULTIPLA

Come già precedentemente dichiarato, vi è sempre una maggiore evidenza del fatto che la patologia corticale possa svolgere un ruolo importante nel determinare la disabilità clinica nella SM²⁰⁸⁻²¹⁰. In uno studio di Rinaldi et al.²¹¹, è stata dimostrata l'elevata efficacia di Natalizumab nella prevenzione dell'accumulo di lesioni

corticali (CLs) nei pazienti con malattia in rapida evoluzione resistente alla terapia. Questo effetto di NTZ è risultato parallelo a quello osservato nella sostanza bianca sottocorticale e, in effetti, i risultati sulla prevenzione della patologia della sostanza bianca (lesioni T2 e nuove lesioni T1 Gd-enhancing) si sono mostrati coerenti con studi precedenti²¹². Si è pertanto giunti alla conclusione che l'efficacia clinica di questo farmaco potrebbe essere in parte dovuta proprio alla sua capacità di rallentare i processi neuropatologici che hanno luogo nella corteccia dei pazienti affetti da SM. La riduzione simultanea della patologia a carico di WM e GM osservata nei pazienti trattati con Natalizumab, può indicare che entrambi questi aspetti della patologia della SM siano collegati al transito dei linfociti attraverso la barriera ematoencefalica, considerato l'evento primario nella neuroinfiammazione. Inoltre, la scomparsa di alcune lesioni corticali durante la terapia depone a favore della loro origine infiammatoria piuttosto che neurodegenerativa (*figura 10*).

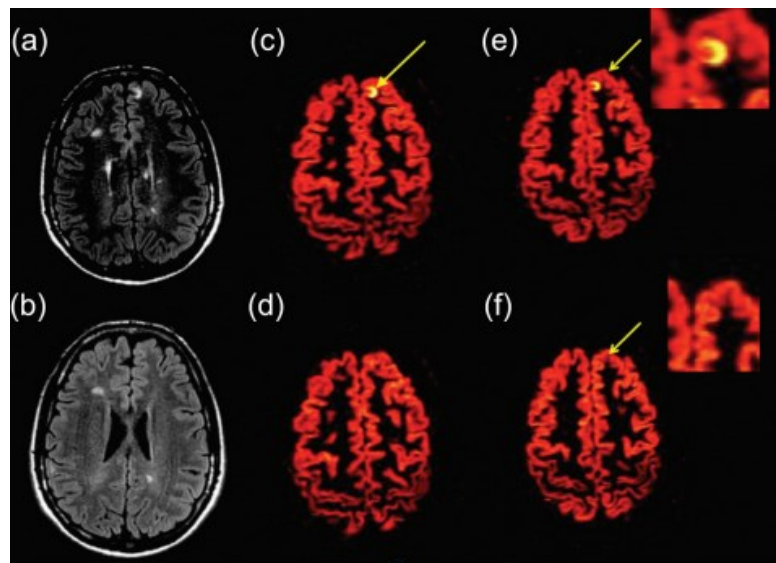


Figura 10. Immagini Flair (a) e DIR ((c), (e): sezioni contigue) di una lesione corticale al basale in un paziente con SMRR di 36 anni. Flair (b) e DIR ((d), (f): sezioni contigue) immagini dello stesso paziente dopo 2 anni di terapia con natalizumab. La freccia indica una CL che era presente al basale e che è completamente scomparsa dopo la terapia.

Successivamente all'inserimento delle lesioni corticali nei criteri diagnostici della SM per la dimostrazione della disseminazione spaziale⁷³ e nei parametri neuroradiologici inclusi nella definizione di NEDA-3, uno studio osservazionale prospettico monocentrico è stato condotto da Puthenparampil et al.²¹³ con lo scopo di confrontare la capacità di Fingolimod e Natalizumab nel sopprimere l'attività di malattia e indurre quindi il NEDA-3 secondo la più recente definizione (nessuna

progressione all'EDSS, nessuna ricaduta clinica, nessuna attività alla RM, con l'aggiunta delle lesioni corticali tra i parametri neuroradiologici).

Nella maggior parte dei parametri clinici e radiologici, Natalizumab è risultato superiore a Fingolimod e l'incorporazione delle CLs nella definizione di NEDA-3 ha ulteriormente confermato la sua maggiore efficacia nel sopprimere l'infiammazione cerebrale nella SMRR.

Sebbene l'atrofia cerebrale costituisca un aspetto rilevante nella patologia della SM²¹⁴, in letteratura sono disponibili risultati controversi sugli effetti di Natalizumab su di essa. Queste discrepanze possono essere principalmente spiegate dal marcato effetto di *pseudoatrofia* osservato nei pazienti con SM trattati con Natalizumab, specialmente in quelli con attività di malattia molto elevata e provenienti dal fallimento di un trattamento di prima linea. Inoltre, sempre in pazienti con un'attività di malattia molto elevata, è stato riscontrato che l'infiammazione della sostanza bianca al basale influenza fortemente le misure del volume cerebrale fino a 18-24 mesi dopo l'inizio di Natalizumab^{215,216}.

Per quanto riguarda la patologia della sostanza bianca, uno studio longitudinale recente di Sucksdorff et al.²¹⁷ ha valutato se il trattamento con Natalizumab riduca l'attivazione microgliale nella NAWM del cervello dei pazienti SM, tramite l'impiego di PET imaging in vivo che impiegava come radioligando una molecola legante TSPO (*Translocator Protein*), mirata proprio alla microglia attivata. Pochi studi longitudinali TSPO-PET avevano già affrontato gli effetti terapeutici sulla microglia²¹⁸⁻²²¹ indicando l'efficacia nel ridurre l'attivazione del sistema immunitario innato all'interno del SNC. Con questo studio essi hanno dimostrato per la prima volta una riduzione dell'attivazione microgliale sia nella NAWM che nel bordo delle lesioni attive croniche, senza però notare variazioni nella microglia della sostanza grigia. Ciò permette di confermare che l'infiammazione diffusa associata alla progressione della SM può essere targettata terapeuticamente attraverso l'utilizzo di validi farmaci antinfiammatori. Gli anticorpi monoclonali, come NTZ appunto, sono proteine di grandi dimensioni probabilmente incapaci di entrare nel SNC in quantità significative attraverso una barriera ematoencefalica intatta²²², per cui il risultato dello studio è principalmente ascrivibile al blocco efficiente dell'ingresso di cellule infiammatorie dalla periferia nel SNC, piuttosto

che all'effetto diretto del farmaco sulla popolazione di cellule immunitarie innate residenti all'interno del SNC. Ad ulteriore conferma di ciò era già stato dimostrato in precedenza su modelli animali che le cellule T autoreattive che entrano nel SNC inducono l'attivazione della microglia ed aumentano l'espressione di TSPO²²³.

L'attivazione della microglia è quindi un processo dinamico associato all'evoluzione della SM e può essere misurata utilizzando l'imaging TSPO-PET longitudinale in vivo. E'opportuno chiarire però che l'espressione di TSPO nel cervello non è specifica per la microglia attivata, anche alcuni astrociti, macrofagi e cellule endoteliali, infatti, esprimono la molecola; tuttavia recenti evidenze provenienti da studi in vitro e su animali suggeriscono che l'aumentata espressione di TSPO nella neuroinfiammazione predomina nella microglia proinfiammatoria²²⁴. È interessante infine notare come il grado più elevato di attivazione microgliale nella NAWM e nelle aree perilesionali nelle immagini PET al basale dei pazienti non trattati, sia correlato ad un maggiore aumento del punteggio EDSS durante un follow-up medio di 4 anni: questa osservazione supporta ancora una volta l'ipotesi che l'attivazione microgliale svolga un ruolo eminente nel contribuire alla disabilità clinica e ribadisce che il livello di attivazione microgliale potrebbe essere utilizzato come biomarcatore di progressione di malattia²¹⁷.

2 Scopo dello studio

Lo studio si propone di:

1. Caratterizzare le modifiche retiniche nei pazienti affetti da SMRR durante la terapia con Natalizumab, con attenzione al volume e allo spessore degli strati della retina peripapillare e maculare;
2. Esplorare l'origine e il significato dei foci iperriflettenti (HRF) in corso di terapia con Natalizumab, sapendo che essi si trovano in numero maggiore nella retina interna dei pazienti SMRR con attività di malattia rispetto ai controlli sani.

3 Materiali e Metodi

3.1 Popolazione di studio

Lo studio condotto è di tipo longitudinale prospettico, monocentrico. Sono stati reclutati da gennaio 2020 a marzo 2022 pazienti con diagnosi di SMRR con indicazione all'avvio di terapia con Natalizumab presso il Day Hospital della Clinica Neurologica dell'azienda ospedaliera di Padova. In occasione dell'inizio della terapia e di specifiche somministrazioni successive del farmaco sono state acquisite le scansioni OCT complete di sequenza papillare, per la misurazione del pRNFL, e di sequenza volumetrica maculare.

I criteri di inclusione considerati sono stati:

1. Diagnosi di SMRR, secondo i più recenti criteri di Mc Donald (revisione del 2017), con o senza anamnesi positiva per neurite ottica (definita dalla storia clinica, come descritto nell'Optic Neuritis Trial²²⁵) confermata da attenta valutazione oculistica con campimetria computerizzata, dalla presenza di lesioni iperintense a carico del nervo ottico corrispondente individuate in almeno due fette contigue nelle sequenze DIR alla MRI^{226,227} e da un'alterazione congrua dei PEV in termini di velocità di conduzione e/o riduzione in ampiezza delle onde⁸⁹;
2. Indicazione all'avvio di terapia con Natalizumab;
3. Acquisizione di 3 scansioni OCT di cui la prima in corrispondenza della data dell'inizio della terapia o a distanza di massimo un mese da essa (tempo T1), la seconda a distanza di 2 o 3 mesi dall'inizio della terapia (tempo T2), e infine la terza a distanza di 5 o 6 mesi (tempo T3); di alcuni pazienti, quando possibile, è stata acquisita un'ulteriore scansione dopo un tempo di almeno 10 mesi dall'inizio della terapia (tempo T4).

I criteri di esclusione presi in considerazione, invece, sono stati:

- a. Qualsiasi patologia sistemica in grado di determinare patologia retinica diversa da quella oggetto di studio;

- b. Patologia oculistica di rilievo (miopia severa > -6 dp o lunghezza assiale dell'occhio > 26 mm, ipermetropia severa > 5 dp, cilindri > 3 dp, drusen del nervo ottico, cataratta, glaucoma in atto o precedente, altre cause di perdita della vista non attribuibili a SM) e danno retinico da tossici;
- c. SM progressiva;
- d. Trattamento con terapia steroidea ad alte dosi nei 30 giorni precedenti l'acquisizione dell'OCT.

Relativamente ai pazienti arruolati sono stati raccolti poi i seguenti dati: data di nascita, sesso, data d'esordio, data della diagnosi, data d'inizio della terapia con Natalizumab ed eventuali terapie precedenti effettuate, e infine le date delle varie acquisizioni OCT con relativo EDSS calcolato alla visita di routine svolta nella stessa circostanza.

3.2 Protocollo di acquisizione delle immagini OCT

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tomografia a coerenza ottica, con SPECTRALIS®HRA+OCT (Heidelberg Engeneering, Heidelberg, Germany), che unisce la tecnologia SD-OCT all'oftalmoscopia confocale a scansione laser (cSLO) con onda infrarossa (IR, 820 nm). La tecnologia TruTrack™ permette di seguire attivamente l'occhio durante la scansione di tutte le immagini ad alta velocità (40000 scansioni/secondo). Il tracking dei movimenti oculari, grazie all'utilizzo simultaneo di un doppio raggio, permette inoltre di minimizzare gli artefatti dovuti al movimento, di ridurre il rumore di fondo e di variare la traiettoria nel tempo. Il risultato è una correlazione puntuale tra fundus oculi e scansioni OCT, associata al miglioramento della definizione e della nitidezza d'immagine e alla stabilizzazione della stessa per piccoli spostamenti. Le scansioni OCT sono state acquisite senza l'utilizzo di agenti midriatici in una stanza in penombra, con luce naturale, da operatori esperti.

Il protocollo comprendeva:

1. scansione peripapillare circolare di 3.4 mm di diametro centrata sulla testa del nervo ottico per misurare lo spessore dell'RNFL (μm), espresso sia

come globale (pRNFL), sia nei singoli settori temporale (T), temporale superiore (TS), temporale inferiore (TI), fascio papillo-maculare (PMB), nasale (N), nasale superiore (NS), nasale inferiore (NI). Ogni scansione è stata mediata tramite il sistema ART (Automatic Real-Time), che aumenta la qualità delle immagini riducendo gli artefatti dovuti al movimento e ottimizzando il rapporto segnale/rumore. Per la scansione peripapillare sono state considerate valide immagini con un ART compreso tra 90 e 100 (*figure 11 e 13*);

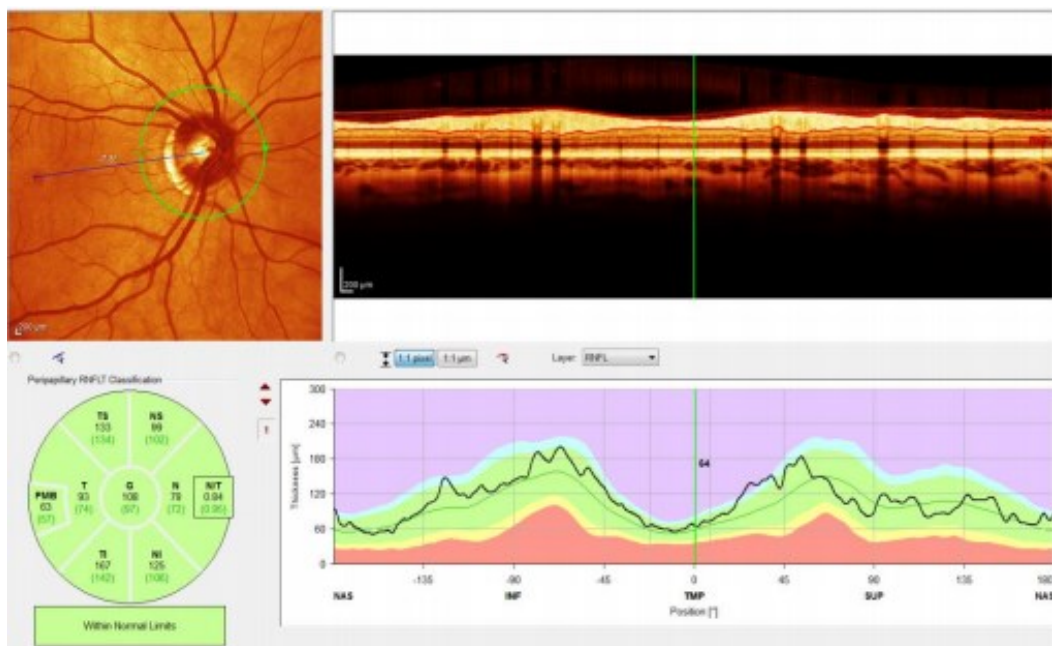


Figura 11. Schermata di visualizzazione della scansione per l'analisi dello spessore del pRNFL. Dall'alto in basso in senso orario: immagine del fundus oculi, immagine OCT (visibile la linea di segmentazione del pRNFL), grafico profilo-spessore del pRNFL (la curva nera indica lo spessore del pRNFL misurato, valutato rispetto al database di riferimento) e mappa di suddivisione del pRNFL in settori.

- scansione maculare volumetrica 20x20° centrata automaticamente sulla fovea ottenuta con 25 scansioni verticali B-scan (distanza tra le B-scan 240 μm), ART 49. Il software consente la valutazione del volume maculare totale (VM), calcolato come il volume sotteso da una superficie definita da un cerchio avente per centro la fovea e raggio pari a 2 mm (*figure 12 e 13*). La mappa a 9 settori ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Screening) è una mappa dell'area maculare riconosciuta in campo internazionale. In ciascuno dei quattro quadranti sono visualizzati due numeri: i numeri neri rappresentano i rapporti di spessore retinico, i rossi i

rapporti di volume. Questi numeri rappresentano il rapporto del quadrante interno della griglia “1, 3, 6 mm ETDRS” rispetto al quadrante esterno. I numeri nel centro sono i rapporti di spessore e volume dell'anello interno totale, rispetto all'anello esterno totale. Ogni scansione maculare è stata segmentata automaticamente nei diversi strati retinici, ottenendo i volumi (espressi in mm³) e gli spessori dei seguenti strati di interesse:

- a. Retinal Nerve Fiber Layer maculare (mRNFL);
- b. Ganglion Cell Layer (GCL);
- c. Inner Plexiform Layer (IPL);
- d. Inner Nuclear Layer (INL);
- e. Outer Plexiform Layer (OPL);
- f. Outer Nuclear Layer (ONL).

GCL e IPL sono stati inoltre raggruppati in un unico strato (GCIP), e così pure OPL e ONL (OPNL), in conformità alla letteratura.

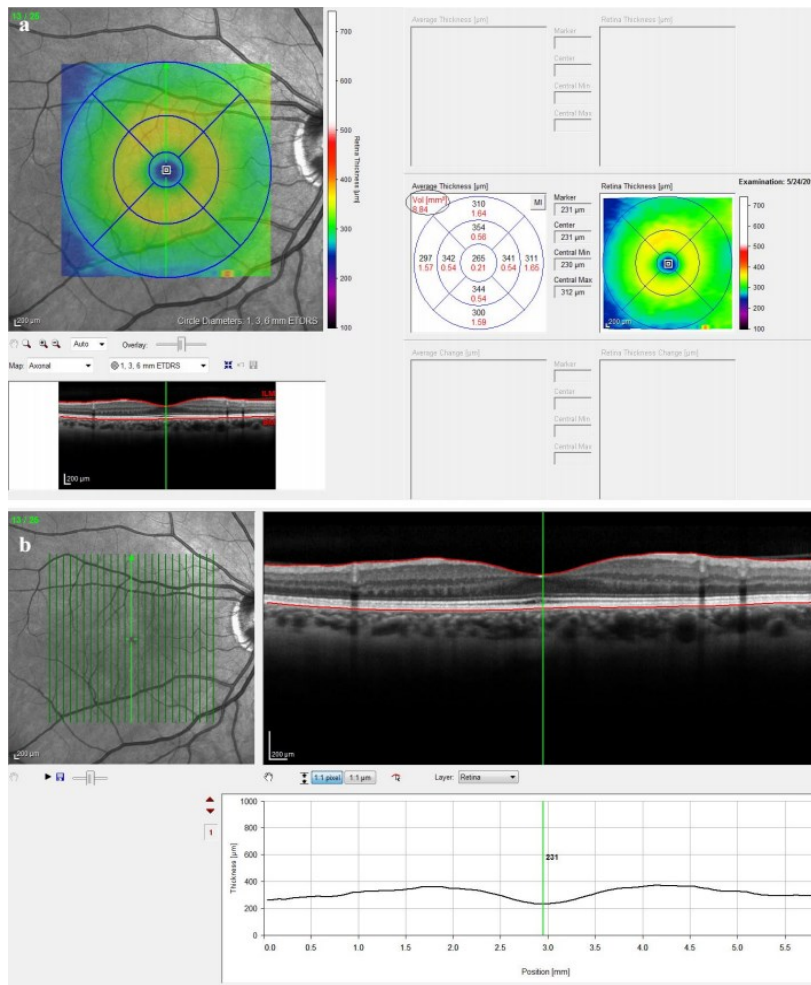


Figura 12. Scansione maculare. a) mappa a 9 settori ETDRS; b) schermata di acquisizione e segmentazione degli strati retinici.

Tutte le scansioni peripapillari e maculari sono state segmentate automaticamente, usando il software fornito dal macchinario. In particolare, un algoritmo automatico definisce lo spessore del pRNFL e i volumi totali degli strati maculari basandosi sulle differenze cromatiche nella scala di grigio corrispondenti agli indici di riflettività propri di ciascuno strato.

Ogni scansione SD-OCT è stata quindi rivalutata da parte di un neurologo esperto, al fine di applicare, se necessario, una correzione manuale della segmentazione, garantendo pertanto l'accuratezza della stratificazione (figura 13).

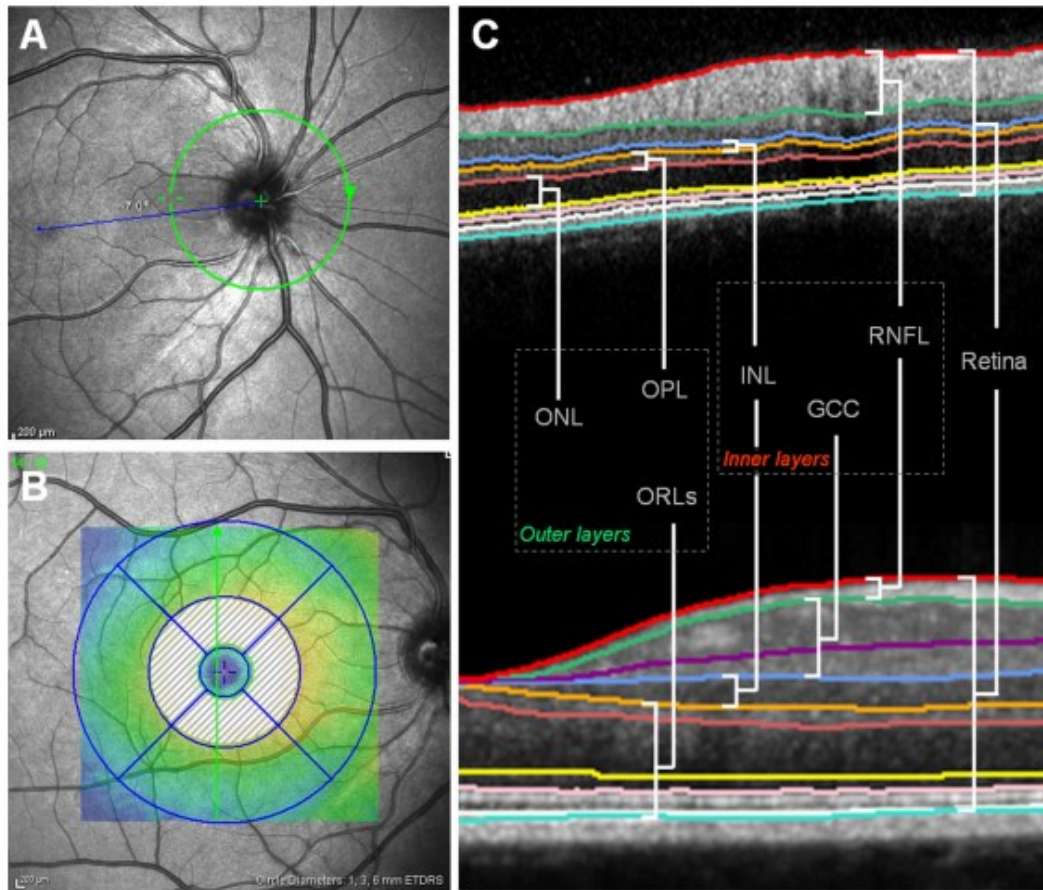


Figura 13. L'immagine mostra le due scansioni OCT nel protocollo di studio: **A)** scansione peripapillare attorno alla testa del nervo ottico. **B)** scansione volumetrica maculare centrata sulla fovea. **C)** dettaglio della sezione trasversale retinica e dei singoli strati retinici dopo la segmentazione; in particolare, si può notare come il RNFL sia maggiormente rappresentato a livello peripapillare (dove viene appunto generalmente studiato) rispetto alla sezione maculare, mentre i restanti inner layers (GCL e INL) siano più spessi a livello della sezione maculare. Adattato da Balk LJ, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014; 0:1–8.

Lo studio longitudinale è stato condotto utilizzando la metodica automatica *rescan mode*, che garantisce il centramento automatico dell'immagine da parte dello strumento, basandosi sulla scansione di riferimento acquisita per ciascun soggetto. Questo consente di minimizzare l'errore dovuto alla diversa posizione o ai movimenti del paziente, e all'acquisizione delle scansioni da parte di diversi operatori.

La qualità delle scansioni OCT è stata valutata secondo i criteri OSCAR-IB (Obvious problems, poor Signal strength, Centration of scan, Algorithm failure, Retinal pathology other than MS related, Illumination and Beam placement)²²⁸. Scansioni di qualità non adeguata sono state escluse dall'analisi.

I risultati del lavoro sono riportati secondo le raccomandazioni recentemente riviste dell'*Advised Protocol for OCT Study Terminology and Elements* (APOSTEL 2.0),

che sono state formulate dagli esperti dell'*International Multiple Sclerosis Visual System (IMSVISUAL) Consortium* al fine di standardizzare e migliorare la qualità della descrizione dei parametri quantitativi di OCT negli studi scientifici²²⁹.

3.3 Foci iperriflettenti intraretinici (HRF)

In linea con alcune recenti pubblicazioni^{194,230} per il conteggio degli HRF è stata presa in considerazione solo la scansione maculare lineare centrale passante attraverso la fovea. I foci sono stati contati in un'area compresa tra due linee perpendicolari alla membrana di Bruch tracciate a 1500 μm , sia temporalmente che nasalmente dal centro della fovea. Gli HRF sono stati definiti come elementi isolati, di piccole dimensioni ($<30 \mu\text{m}$), puntiformi, con una riflettività moderata (simile a quella del RNFL) ma senza alcuna ombra posteriore (*figura 11*). La loro conta è stata effettuata negli strati retinici interni (GCL, IPL, INL) e la loro presenza messa in relazione alla variazione del volume totale del medesimo strato retinico nei vari time points considerati.

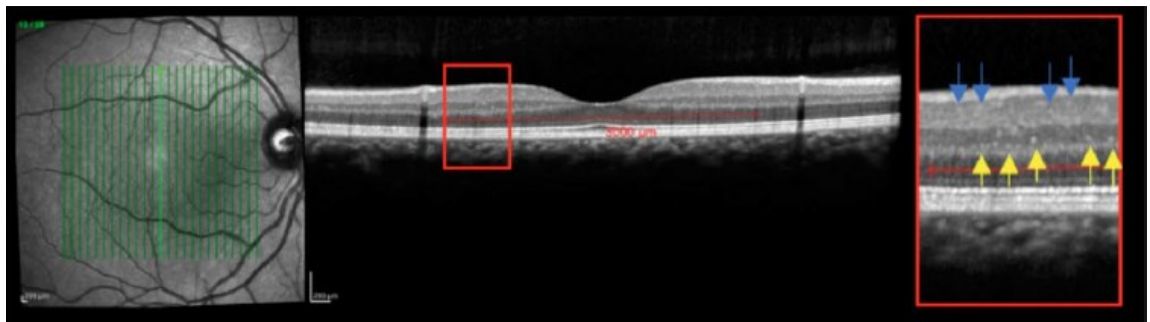


Figura 14. Protocollo HRF. Scansione lineare centrata sulla macula e passante attraverso la fovea. I foci a livello dell'INL sono indicati da frecce gialle. Mentre quelli all'interno di GCL e IPL da frecce blu.

3.4 Analisi statistica

I risultati ottenuti dall'analisi statistica dei dati sono stati riportati come media (SD) per le variabili continue, e come N (%) per le variabili categoriche. Sono stati utilizzati modelli a effetti misti con intercetta casuale per il soggetto e l'occhio all'interno del soggetto per valutare l'effetto in continuo del tempo, e per confrontare ogni time point con il basale (T1). Tutti i modelli sono stati corretti per età, sesso e numero di trattamenti precedenti. Il numero di HRF nei vari strati retinici (calcolato per ciascuno strato come media dei due occhi) è stato confrontato nei vari time points mediante test di Mann Whitney per dati appaiati con correzione di Tukey. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software statistico Stata, versione 16.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA), e i valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

4 Risultati

4.1 Descrizione della popolazione di studio

Per il presente studio longitudinale prospettico, effettuato presso il centro Sclerosi Multipla dell'Azienda Ospedaliera di Padova, sono stati reclutati, tra gennaio 2020 e marzo 2022, 29 pazienti SMRR (pari ad un campione di 58 occhi) di cui sono state acquisite le seguenti scansioni OCT: al basale (T1), nel 70% dei casi corrispondente al giorno della prima infusione di Natalizumab e nella restante parte a distanza di massimo un mese dall'avvio della terapia, a T2, dopo circa 2 mesi (mediana 62 giorni (range IQ 6 giorni)), e a T3, a distanza di circa 5 mesi (mediana 154 giorni (range IQ 8 giorni)). Per 11 pazienti, è stato possibile acquisire un'ulteriore scansione OCT a distanza di circa 1 anno dall'avvio della terapia (mediana 364 giorni (range IQ 74.5 giorni)). Durante tale periodo, i pazienti sono stati trattati con Natalizumab 300 mg ogni 28 giorni come da protocollo.

Le principali caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione dello studio sono riassunte nella *Tabella I*. I soggetti inclusi avevano un'età media di 29 ± 12 anni ed erano costituiti per il 72.41% da donne. La mediana della durata di malattia, calcolata come intervallo di tempo intercorso tra la data della diagnosi e la data di avvio della terapia con Natalizumab, si attestava a 1 mese (range IQ 3 mesi), mentre l'EDSS mediano al basale risultava pari a 1.0 (range 1.0-5.5). Il 24% dei pazienti (7/29) ha presentato un esordio clinico di malattia caratterizzato da neurite ottica monoculare definita secondo i criteri già descritti in precedenza.

	SMRR (N=29)
Età media \pm SD (a)	29 \pm 12
Sesso F (%)	21 (72.41)
Mediana durata di malattia (range IQ) (m)	1 (3)
Mediana EDSS basale (range)	1.0 (1.0-5.5)
NO (%)	7 (24)

Tabella I. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti SMRR. a: anni, m: mesi, EDSS: Expanded Disability Status Scale, NO: neurite ottica.

Per quanto riguarda la somministrazione di eventuali trattamenti precedenti, sei pazienti/29 (20.7%) avevano già eseguito altre terapie immunomodulatorie, prevalentemente di prima linea, mentre il 79.3% dei pazienti (23/29) risultava al primo trattamento con DMT per la SMRR.

Numero trattamenti precedenti	SMRR, N=29 (%)
0	23 (79.3)
1	2 (6.9)
2	2 (6.9)
3	2 (6.9)

Tabella II. Numero dei precedenti trattamenti dei soggetti studiati.

Relativamente alle variazioni dell'EDSS dei pazienti durante il periodo di osservazione, esso è aumentato in due/29 pazienti (6.9%) ma una progressione di disabilità (espressa come peggioramento dell'EDSS ≥ 1 in pazienti con EDSS < 5.5, confermato a 6 mesi) si è verificata solo in uno di questi; è rimasto costante in ventidue/29 pazienti (75.86%) e, infine, si è ridotto in cinque/29 pazienti (17.24%).

4.2 Analisi dei parametri OCT

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dalle analisi effettuate sulle variazioni dei volumi e degli spessori degli strati della retina peripapillare e maculare, oltre che quelli relativi alle modifiche dei foci iperriflettenti riscontrati nel contesto della retina più interna e, in particolare, nel GCL, nell'IPL e nell'INL.

Effetto di Natalizumab sul pRNFL

Abbiamo inizialmente osservato l'effetto di Natalizumab sullo spessore del pRNFL suddiviso nei vari settori, in quanto già descritto come possibile marker di neurodegenerazione. Da una prima analisi ottenuta calcolando la media dei vari spessori registrati in ogni quadrante, di entrambi gli occhi, in corrispondenza di ciascun time point, si ottengono i dati riassunti nella *Tabella III*.

	SPESSORE MEDIO ± SD (µm)			
	T1	T2	T3	T4
pRNFL-G	98.40±14.38	99.70±13.62	100.22±13.82	97.67±12.46
pRNFL-PMB	48.72±11.02	49.86±10.92	49.40±10.91	47.95± 0.06
pRNFL-NTRatio	1.21±0.40	1.18±0.38	1.21±0.42	1.34±0.44
pRNFL-NS	115.52±20.85	117.25±21.16	118.24±21.25	115.62±18.16
pRNFL-N	72.90±14.55	73.00±13.58	74.21±14.96	77.62±13.71
pRNFL-NI	119.00±24.37	119.93±23.79	121.57±24.74	122.57±25.27
pRNFL-TS	138.78±26.86	141.86±25.57	141.90±25.81	133.57±22.34
pRNFL-T	64.46±15.48	65.65±15.01	65.26±14.92	61.2±12.95
pRNFL-TI	138.64 ±28.48	141.16±28.07	141.14±27.56	131.05±25.22

Tabella III. Spessore medio dei vari settori del pRNFL a ciascun time point. G= globale, PMB= fascio papillo-maculare, N= nasale, NS= nasale superiore, NI= nasale inferiore, T=temporale, TS= temporale superiore, TI= temporale inferiore, NTRatio= rapporto nasale-temporale.

Successivamente, si riporta l'andamento degli spessori del pRNFL in ciascun quadrante, considerando i valori relativi a T1 come riferimento ed esprimendo quelli di T2 e T3 in relazione ad esso (Figura 15). Si è scelto in questo caso, e analogamente per i successivi parametri, di escludere gli spessori misurati al quarto time point (T4) a causa della scarsa numerosità degli stessi (N=11, per un totale di 22 occhi). Si sottolinea come qui la significatività statistica si raggiunga nel confronto del pRNFL-TS tra T3 e T1 (p= 0.0099), e in quello del pRNFL-T tra T2 e T1 (p=0.0309), dove si registra una tendenza all'aumento.

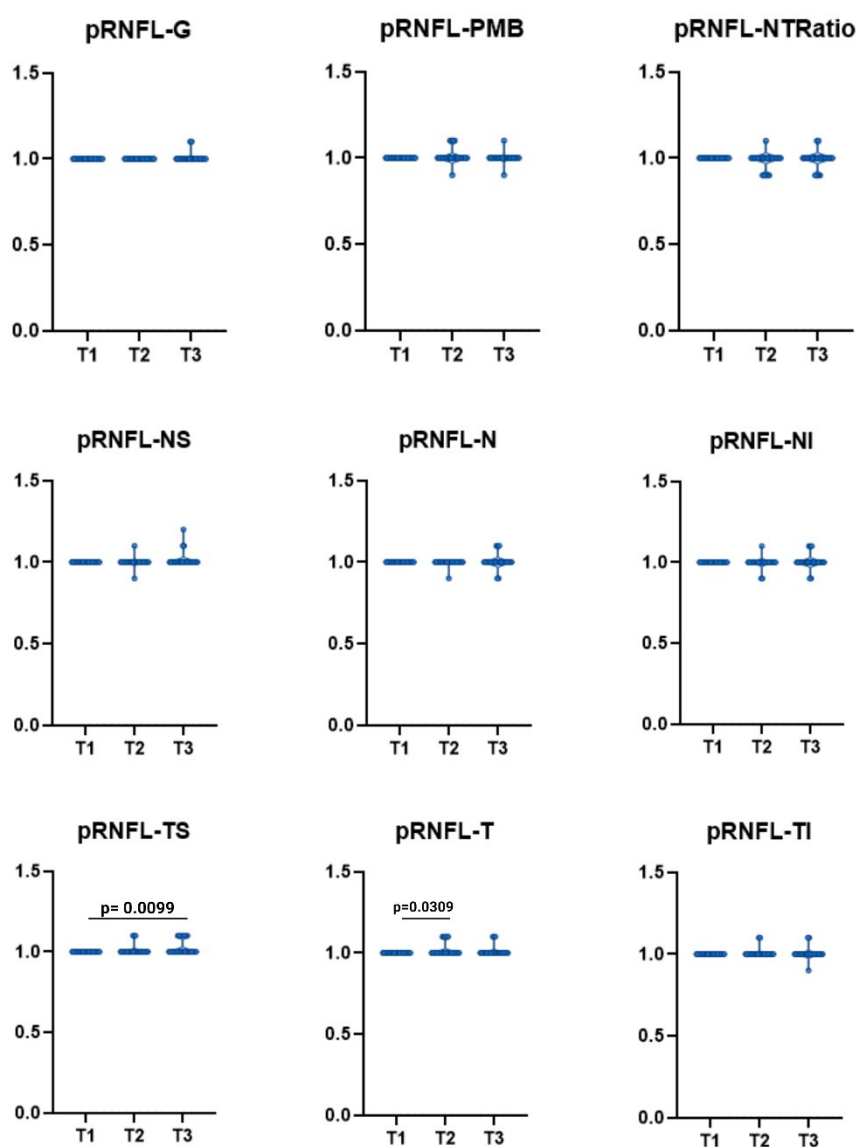


Figura 15. Confronto spessore pRNFL nei vari quadranti ai diversi time points, considerando T1 come riferimento.

Infine, l'analisi statistica, eseguita per studiare l'effetto in continuo del tempo sulla misura dello spessore del pRNFL nei vari settori, ha prodotto risultati statisticamente significativi solo per il pRNFL-NTRatio ($p=0.039$) e per il pRNFL-TS ($p=0.032$), dove si registra rispettivamente una tendenza alla riduzione ed una all'aumento (Tabella IV).

Settore peripapillare	p value
pRNFL-G	0.093
pRNFL-PMB	0.435
pRNFL-NTRatio	0.039 ($\beta=-0.01$, $SE=0.005$)
pRNFL-NS	0.175
pRNFL-N	0.277
pRNFL-NI	0.463
pRNFL-TS	0.032 ($\beta=0.59$, $SE=0.27$)
pRNFL-T	0.127
pRNFL-TI	0.184

Tabella IV. Significatività statistica degli spessori peripapillari per ogni settore.

Effetto di Natalizumab sui volumi e sugli spessori maculari

In seguito abbiamo analizzato, in maniera del tutto analoga, l'effetto di Natalizumab sui volumi e sugli spessori maculari. Sempre attraverso il calcolo della media dei valori registrati per ciascuno strato in entrambi gli occhi, e ad ogni time point, si sono ottenuti i dati riportati nelle tabelle sottostanti (Tabella V e Tabella VI). Per quanto riguarda gli spessori, abbiamo sintetizzato i valori relativi ad ogni settore di ciascuno dei due anelli (interno ed esterno) in cui la macula viene suddivisa, con la loro media.

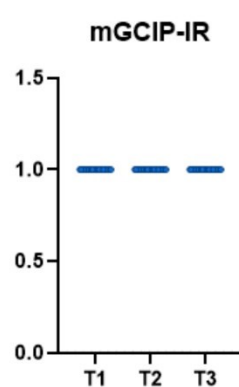
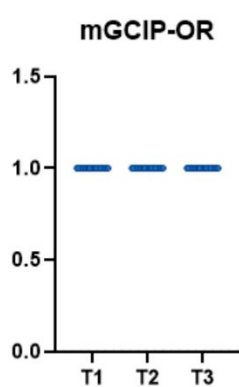
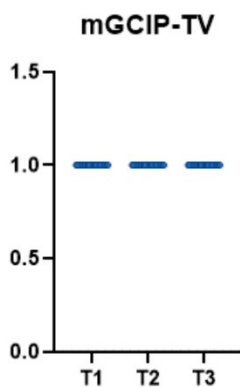
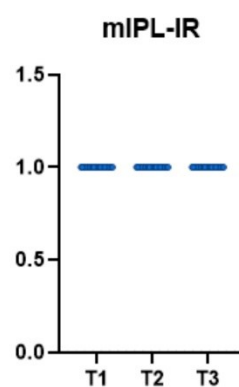
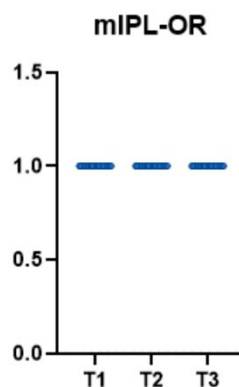
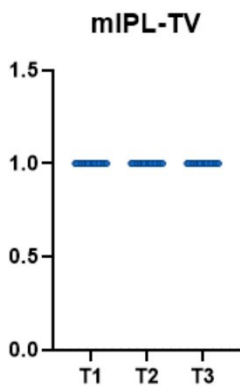
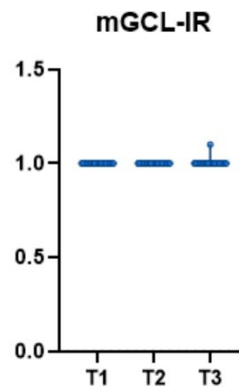
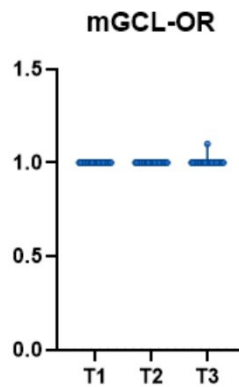
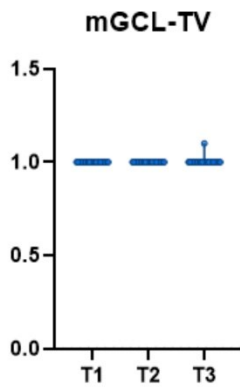
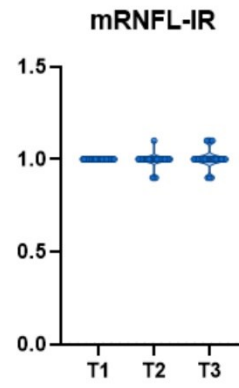
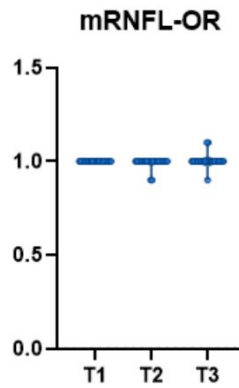
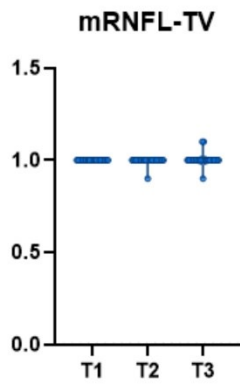
	VOLUME MEDIO \pm SD (mm ³)			
	T1	T2	T3	T4
mRNFL-TV	0.8 \pm 0.11	0.82 \pm 0.11	0.83 \pm 0.11	0.79 \pm 0.09
mGCL-TV	1.08 \pm 0.14	1.09 \pm 0.13	1.09 \pm 0.13	1.06 \pm 0.11
mIPL-TV	0.90 \pm 0.10	0.91 \pm 0.09	0.90 \pm 0.09	0.89 \pm 0.08
mGCIP-TV	1.98 \pm 0.23	1.99 \pm 0.22	1.99 \pm 0.22	1.96 \pm 0.18
mINL-TV	0.98 \pm 0.06	0.98 \pm 0.06	0.98 \pm 0.06	0.98 \pm 0.06
mOPL-TV	0.82 \pm 0.07	0.82 \pm 0.08	0.81 \pm 0.07	0.84 \pm 0.10
mONL-TV	1.74 \pm 0.18	1.73 \pm 0.18	1.74 \pm 0.18	1.70 \pm 0.17
mOPNL-TV	2.55 \pm 0.17	2.55 \pm 0.18	2.55 \pm 0.18	2.53 \pm 0.17

Tabella V. Volume medio di ciascuno strato maculare. TV= total volume.

	SPESSORE MEDIO ± SD (µm)			
	T1	T2	T3	T4
mRNFL-OR	32.15±4.83	32.27±4.69	32.59±4.78	31.07±3.60
mRNFL-IR	19.77±2.17	19.68±2.42	19.92±2.29	19.26±1.93
mGCL-OR	36.07±4.21	36.24±4.03	36.35±3.95	35.52±3.05
mGCL-IR	48.67±8.69	48.81±8.07	48.96±7.93	47.81±6.94
mIPL-OR	29.67±3.06	29.84±3.07	29.73±2.99	29.31±2.50
mIPL-IR	40.93±5.39	41.25±5.17	40.85±5.18	40.43±4.16
mGCIP-OR	65.74±7.17	66.08±7.01	66.09±6.83	64.83±5.37
mGCIP-IR	89.60±13.93	90.06±13.12	89.81±1.02	88.24±10.99
mINL-OR	34.06±1.86	34.00±2.10	34.05±2.08	34.08±1.66
mINL-IR	39.17±3.62	38.65±3.65	38.90±3.62	38.84±4.38
mOPL-OR	27.91±2.00	27.93±2.54	27.69±2.32	28.18±2.74
mOPL-IR	32.72±4.17	33.20±4.65	32.73±4.44	34.63±6.29
mONL-OR	57.71±6.40	57.69±6.49	57.94±6.50	56.65±6.39
mONL-IR	70.75±7.55	70.31±7.68	70.60±7.71	67.95±6.90
mOPNL-OR	85.61±6.23	85.62±6.46	85.62±6.47	84.83±6.33
mOPNL-IR	103.47±6.47	103.50±6.78	103.33±6.95	102.58±7.02

Tabella VI. Spessore medio di ciascuno strato maculare suddiviso nei due anelli. OR= outer ring, IR= inner ring.

Con gli stessi criteri enunciati precedentemente, si riporta l'andamento dei volumi e degli spessori di ciascuno strato retinico rispetto al riferimento T1 (Figura 16), sottolineando come la significatività statistica non venga raggiunta in nessun caso.



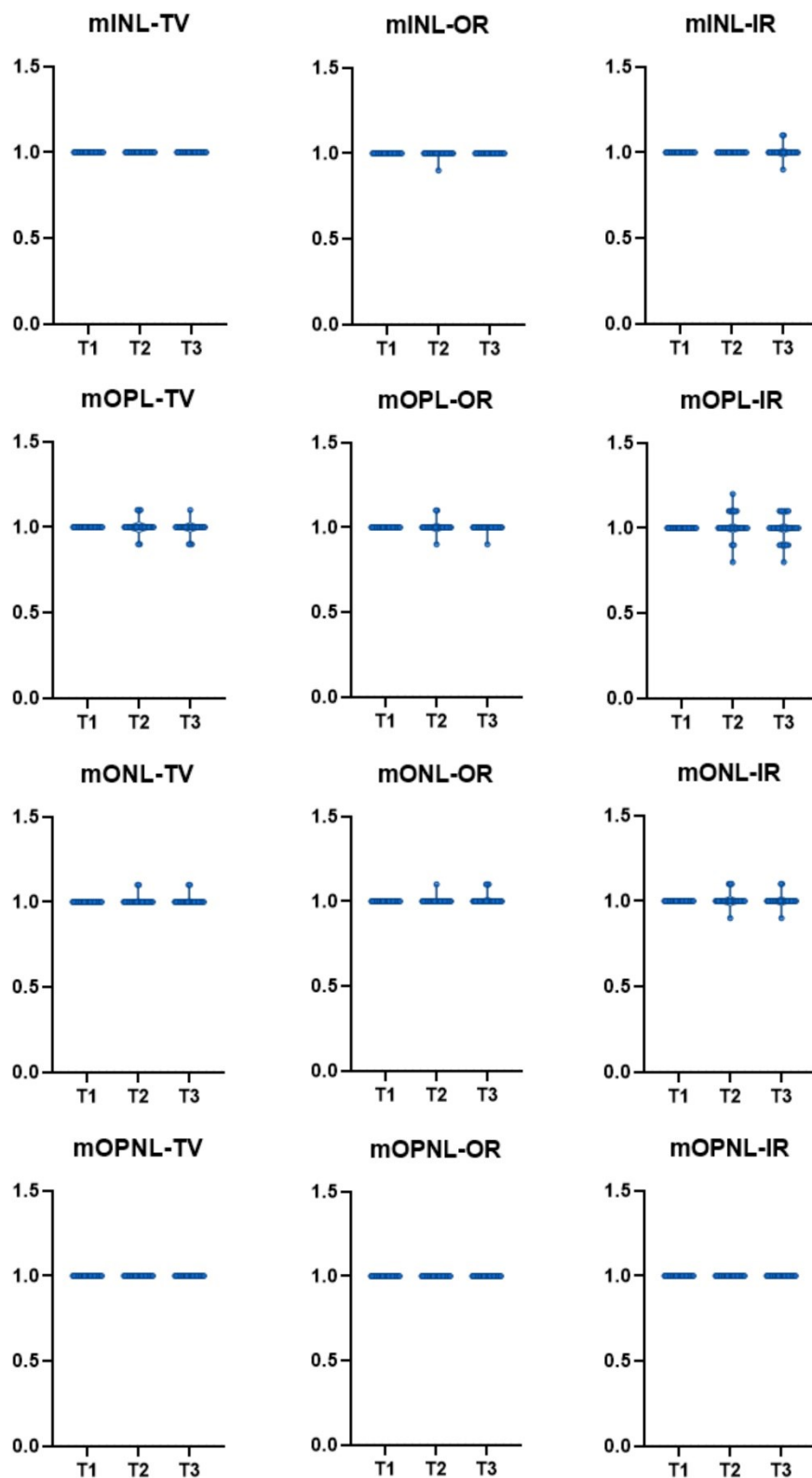


Figura 16. Confronto volume e spessori maculari dei vari strati retinici ai diversi time points, considerando T1 come riferimento.

Osservando i grafici è possibile quindi evidenziare come complessivamente non si registrino importanti variazioni tra T2 e T3 rispetto al basale, sia in termini di spessori che in termini di volumi, delineando una sostanziale stabilità.

Per quanto riguarda, invece, l'analisi statistica eseguita per studiare l'effetto in continuo del tempo sulla misura dei volumi e degli spessori dei vari strati della macula retinica, si sono ottenuti risultati statisticamente significativi solo per il mIPL-TV ($p= 0.043$) e per il mOPL-OR ($p= 0.009$) dove si verifica una tendenza alla riduzione, e per il mONL-OR ($p= 0.039$), dove invece si registra una tendenza all'aumento (*Tabella VII*).

Strati retinici	p value
mRNFL-TV	0.329
mRNFL-OR	0.255
mRNFL-IR	0.883
mGCL-TV	0.771
mGCL-OR	0.798
mGCL-IR	0.736
mIPL-TV	0.043 ($\beta=-0.002$, $SE=0.001$)
mIPL-OR	0.291
mIPL-IR	0.071
mGCIP-TV	0.134
mGCIP-OR	0.394
mGCIP-IR	0.113
mINL-TV	0.252
mINL-OR	0.119
mINL-IR	0.915
mOPL-TV	0.157
mOPL-OR	0.009 ($\beta=-0.15$, $SE=0.06$)
mOPL-IR	0.741
mONL-TV	0.225
mONL-OR	0.039 ($\beta=0.19$, $SE=0.09$)
mONL-IR	0.687

mOPNL-TV	0.814
mOPNL-OR	0.621
mOPNL-IR	0.996

Tabella VII. Significatività statistica dei valori registrati per ciascuno strato della retina maculare.

Effetto di Natalizumab sugli HRF

In conclusione abbiamo studiato il comportamento degli HRF durante la terapia con Tysabri nei 29 pazienti di interesse. Nella *Tabella VIII* essi vengono espressi come media calcolata sui valori ottenuti in ciascuno strato di entrambi gli occhi ad ogni time point.

	NUMERO MEDIO ± SD			
	T1	T2	T3	T4
HRF GCL	17.60±6.00	18.85±6.02	18.45±5.99	20.83±6.04
HRF IPL	25.67±8.00	26.02±9.62	26.71±8.84	24.67±4.89
HRF GCIP	43.27±12.79	44.87±14.03	45.16±13.59	45.50±8.85
HRF INL	35.08±7.74	37.09±9.03	37.04±8.89	37.08±8.62

Tabella VIII. Numero medio degli HRF negli strati retinici interni a ciascun time point.

Analogamente ai precedenti parametri, si riporta, infine, l'andamento dei foci di ciascuno strato retinico di interesse rispetto al riferimento T1 (*Figura 18*). Qui la significatività statistica si raggiunge solo nel confronto degli HRF del GCL tra T2 e T1 ($p= 0.0489$), sebbene si noti in tutti gli strati una chiara tendenza all'aumento fin dai primi mesi.

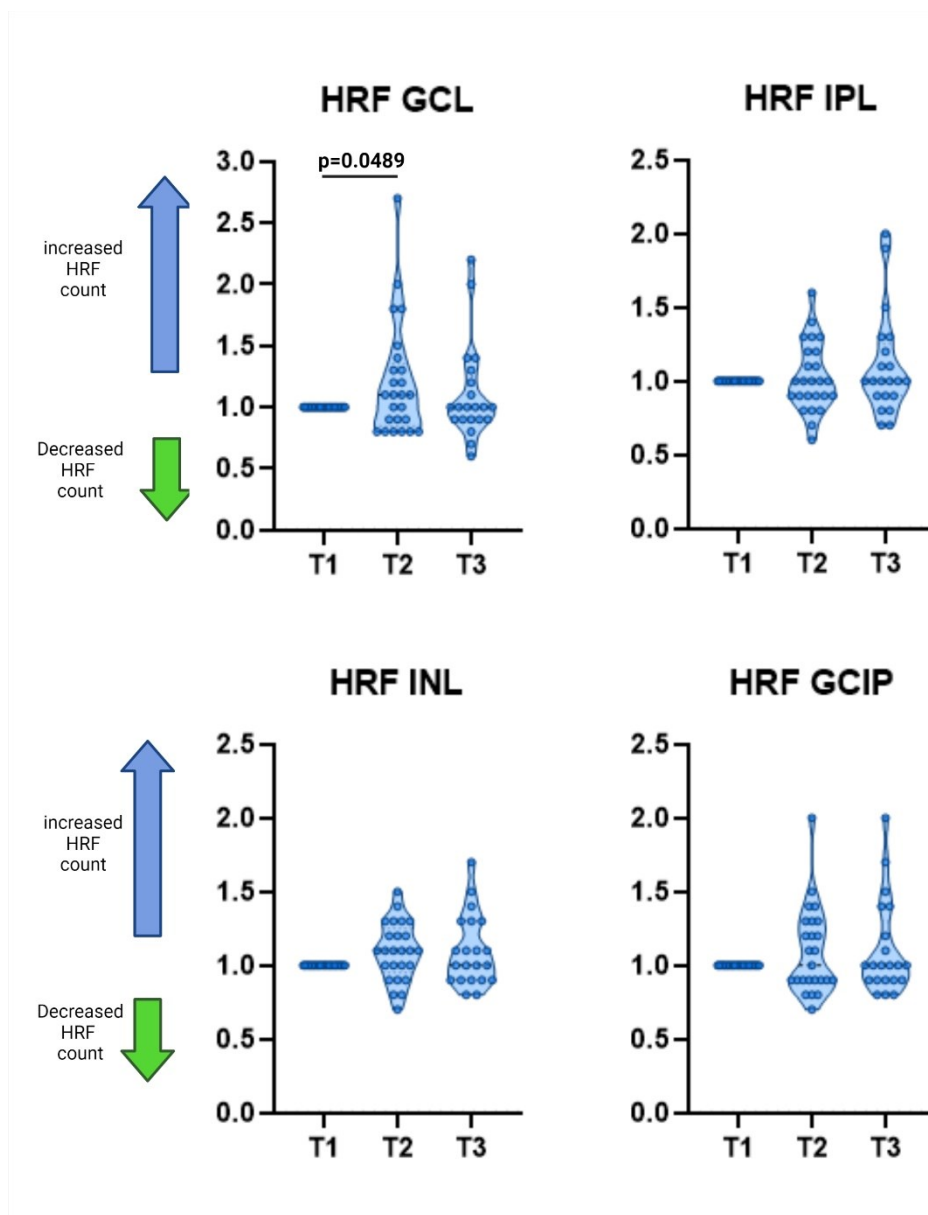


Figura 17. Andamento degli HRF nei vari strati retinici interni ai diversi time points, considerando T1 come riferimento.

Infine, l'analisi statistica per lo studio dell'effetto in continuo del tempo ha prodotto i risultati riportati nella *Tabella IX*, con una tendenza alla significatività per gli HRF nell'INL ($p= 0.053$) che mostrano un andamento crescente.

Strati retinici	p value
HRF GCL	0.133
HRF IPL	0.999
HRF GCIP	0.471
HRF INL	0.053 ($\beta=0.98$, $SE=0.51$)

Tabella IX. Significatività statistica dei valori di HRF registrati per ciascuno strato della retina maculare.

5 Discussione

Questo studio longitudinale prospettico è stato condotto per valutare l'effetto di Natalizumab sulla retina dei pazienti affetti da SMRR. Data l'efficacia immediata e duratura del farmaco nel sopprimere l'attività infiammatoria nella SMRR^{201,211,213}, e visti i dati preliminari della letteratura che suggeriscono un effetto del farmaco sulla microglia in vivo²¹⁷, abbiamo ritenuto meritevole lo svolgimento di questa analisi. In particolare, si è deciso di porre l'attenzione sulle modifiche di volume e spessore degli strati della retina peripapillare e maculare, e sul comportamento dei foci iperriflettenti situati nella retina interna, in modo da poterne esplorare origine e significato. I risultati ottenuti hanno evidenziato, da un lato, una complessiva stabilità dei volumi e degli spessori della retina peripapillare e maculare emersa nel confronto tra i vari time points, dall'altro un sostanziale aumento del numero dei foci iperriflettenti fin dai primi mesi dopo l'inizio della terapia; quest'ultimo rappresenta un fenomeno apparentemente contraddittorio che necessita di ulteriori approfondimenti.

EFFETTO DI NATALIZUMAB SUI VOLUMI E SUGLI SPESSORI RETINICI

La complessiva stabilità, registrata dal confronto dei volumi e degli spessori della retina ai vari time points rispetto al basale, ci porterebbe ad affermare che Natalizumab non abbia prodotto un effetto antinfiammatorio a livello retinico. Questo sembrerebbe in contraddizione con quanto affermato dallo studio di Knier et al.⁹⁴ dove è emerso, invece, che i pazienti rispondenti alle terapie immunomodulanti di prima e seconda linea mostravano una riduzione significativa dello spessore dell'INL, segno della riduzione dell'attività infiammatoria. La riduzione dell'INL si accompagnava, inoltre, alla diminuzione del rischio di comparsa di nuove lesioni in T2 e di ricadute, oltre che al raggiungimento del NEDA-3. Questo ha portato a stabilire una correlazione tra la riduzione dell'INL dopo almeno 6 mesi di terapia e l'efficacia del trattamento, indipendentemente dalla modalità di azione dello specifico agente immunomodulante. Tuttavia, è opportuno sottolineare che, all'interno dello stesso studio, sono stati inclusi 47 pazienti SMRR

avviati ad una terapia di prima linea e 25 avviati ad una terapia di seconda linea, di cui solo 8 erano in trattamento con Natalizumab. Avendo appurato che il trattamento con fingolimod e l'effetto antinfiammatorio multilivello degli interferoni riducono la risposta infiammatoria sistemica anche nella retina, permettendo al sistema glinfatico retinico di recuperare la sua funzione e di conseguenza causando una riduzione del volume dell'INL¹⁰⁸, ulteriori studi sono richiesti invece per confermare lo specifico effetto di Natalizumab sui volumi e sugli spessori degli strati retinici.

EFFETTO DI NATALIZUMAB SUGLI HRF RETINICI

Diversi studi suggeriscono che la microglia sia ampiamente attivata nella SM, sia nella sostanza bianca che nella sostanza grigia, e nelle cosiddette NAWM e NAGM^{30,40,184,185}. In effetti, si ritiene che la microglia attivata svolga un ruolo fondamentale nell'infiammazione del SNC, orchestrando un complesso intreccio di modificazioni locali, che coinvolge tutte le cellule immunitarie infiltranti e le cellule gliali circostanti, creando un ambiente fertile per l'attività proinfiammatoria di cellule B e T autoreattive¹⁸⁷. Da un recente studio di Pilotto et al.¹⁹⁴ è emerso come, presumibilmente, l'attivazione della microglia avvenga prima di qualsiasi processo neurodegenerativo retinico, meritando un'indagine come possibile marker prognostico nella SM. Sulla base di quanto detto, l'aumento significativo degli HRF nei vari strati della retina interna sembrerebbe in contraddizione con l'effetto antinfiammatorio del farmaco, e due sono le ipotetiche interpretazioni che possiamo addurre, basandoci sui diversi meccanismi fisiopatologici.

Secondo una prima ipotesi, la proliferazione microgliale retinica, osservata in corso di terapia con Natalizumab, potrebbe essere il risultato del passaggio di queste cellule da uno stato attivato in senso pro-infiammatorio, ad uno "alternativamente attivato" o antinfiammatorio. La microglia "alternativamente attivata" è caratterizzata da un soma più piccolo e da processi molto ramificati che controllano costantemente il microambiente circostante; essa è associata ad un'aumentata capacità angiogenica ed è in grado di secernere fattori neurotrofici (*Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF), *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1)), oltre che diverse citochine anti-infiammatorie come IL-10 e

TGF- β . Astrociti e cellule di Müller si sono dimostrati capaci di interagire con le cellule microgliali e di influenzarne lo stato di attivazione sulla base dei segnali ricevuti dal microambiente circostante, suggerendoci, quindi, che l'aumento degli HRF vada considerato anche alla luce delle diverse, talora opposte, funzioni svolte dalla microglia.

Tuttavia, non possiamo escludere con certezza che l'aumento degli HRF osservato sia espressione della proliferazione microgliale attivata in senso proinfiammatorio. In questo caso le cellule microgliali sono caratterizzate da morfologia ameboide e dotate di pochi processi, corti e sottili, dalle numerose funzioni: rilasciano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ), metalloproteinasi (MMPs) di matrice e si occupano della fagocitosi di agenti patogeni e detriti cellulari, in aggiunta all'attività di presentazione dell'antigene. La seconda ipotesi, quindi, contempla la possibilità che la microglia proinfiammatoria possa rimanere attiva nella retina dei pazienti in terapia con NTZ a causa dello stesso meccanismo d'azione del farmaco: la tipica funzione di cellula APC, infatti, verrebbe meno a causa del sequestro dei linfociti CD4⁺ all'esterno della barriera emato-retinica, con la microglia che, in risposta a questo fenomeno e mantenendo la sua polarizzazione pro-infiammatoria, incrementerebbe la sua attività.

Questa ipotesi può essere riformulata facendo riferimento allo studio di Sucksdorff et al.²¹⁷ in cui è stato dimostrato l'effetto di Natalizumab sulla riduzione dell'attivazione microgliale sia nella NAWM che nel bordo delle lesioni attive croniche, senza però notare variazioni nella microglia della sostanza grigia. È opportuno ribadire che gli anticorpi monoclonali, essendo proteine di grandi dimensioni, sono probabilmente incapaci di entrare nel SNC in quantità significative attraverso una barriera ematoencefalica intatta²²², per cui il risultato dello studio è stato attribuito al blocco efficiente dell'ingresso di cellule infiammatorie dalla periferia nel SNC. In aggiunta a questo aspetto, un successivo studio di Pengo et al.¹⁹⁵ ha fatto emergere una forte associazione tra gli HRF nell'INL e la patologia corticale, suggerendo che la retina e la sostanza grigia potrebbero condividere meccanismi immunopatogenetici comuni. Da questi studi

si può quindi provare a dedurre che, come Natalizumab sembrerebbe non agire sulla microglia della sostanza grigia, analogamente sembrerebbe non avere effetto sulla microglia retinica, portando ad un aumento degli HRF.

6 Conclusioni

Il presente lavoro ha riscontrato, da un lato, una sostanziale stabilità per quanto riguarda gli spessori e i volumi retinici peripapillari e maculari nei pazienti in corso di terapia con Natalizumab, dall'altro un sensibile aumento degli HRF negli strati retinici interni degli stessi pazienti. Quest'ultimo risultato apre la strada a due ipotesi senza la possibilità di affermare in maniera univoca se tale aumento sia interpretabile in senso pro- o anti-infiammatorio, in quanto solo una precisa immunofenotipizzazione delle cellule microgliali retiniche, o un'analisi immunopatologica potrebbero chiarire il tipo di attivazione.

7 Bibliografia

1. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43. doi:10.1038/s41572-018-0041-4
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(13):938-952. doi:10.1056/NEJM200009283431307
3. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol*. 2006;13(7):700-722. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
4. Puthenparampil M, Seppi D, Rinaldi F, et al. Increased incidence of multiple sclerosis in the Veneto region, Italy. *Mult Scler*. 2013;19(5):601-604. doi:10.1177/1352458512461970
5. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol*. 2014;72(3-4):132-141. doi:10.1159/000360528
6. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129-135. doi:10.1212/01.wnl.0000316802.35974.34
7. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520-532. doi:10.1016/S1474-4422(10)70064-8
8. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(2):184-192. doi:10.1212/WNL.0b013e31829a3388
9. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2015;5(9):e00362. doi:10.1002/brb3.362
10. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-558. doi:10.1038/nri3871
11. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):296-301. doi:10.1126/science.abj8222
12. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(12 Suppl):3-9. doi:10.1586/14737175.2013.865866

13. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):115-127. doi:10.1055/s-0036-1579739
14. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):463-477. doi:10.1038/nri3705
15. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2018;378(2):169-180. doi:10.1056/NEJMra1401483
16. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9(6):540-549. doi:10.1191/1352458503ms965oa
17. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014;45(8):687-697. doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.013
18. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47(6):707-717. doi:10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q
19. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):942-955. doi:10.1056/NEJMra052130
20. Lassmann H. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia.* 2014;62(11):1816-1830. doi:10.1002/glia.22597
21. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol.* 2015;6:636. doi:10.3389/fimmu.2015.00636
22. Mishra MK, Yong VW. Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(9):539-551. doi:10.1038/nrneurol.2016.110
23. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2011;14(10):1227-1235. doi:10.1038/nn.2923
24. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014;17(1):131-143. doi:10.1038/nn.3599
25. Sormani MP, Rovaris M, Comi G, Filippi M. A reassessment of the plateauing relationship between T2 lesion load and disability in MS. *Neurology.* 2009;73(19):1538-1542. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c06679

26. Rocca MA, Amato MP, De Stefano N, et al. Clinical and imaging assessment of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015;14(3):302-317. doi:10.1016/S1474-4422(14)70250-9
27. van der Valk P, De Groot CJ. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26(1):2-10. doi:10.1046/j.1365-2990.2000.00217.x
28. Bö L, Mörk S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol.* 1994;51(2):135-146. doi:10.1016/0165-5728(94)90075-2
29. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338(5):278-285. doi:10.1056/NEJM199801293380502
30. Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mørk SJ. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler.* 2003;9(4):323-331. doi:10.1191/1352458503ms917oa
31. Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2001;50(3):389-400. doi:10.1002/ana.1123
32. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:185-217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443
33. van Waesberghe JH, Kamphorst W, De Groot CJ, et al. Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol.* 1999;46(5):747-754. doi:10.1002/1531-8249(199911)46:5<747::aid-ana10>3.3.co;2-w
34. van der Valk P, Amor S. Preactive lesions in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2009;22(3):207-213. doi:10.1097/WCO.0b013e32832b4c76
35. Singh S, Metz I, Amor S, van der Valk P, Stadelmann C, Brück W. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol.* 2013;125(4):595-608. doi:10.1007/s00401-013-1082-0
36. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004;55(4):458-468. doi:10.1002/ana.20016
37. Barkhof F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol.* 2002;15(3):239-245. doi:10.1097/00019052-200206000-00003

38. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 11):2705-2712. doi:10.1093/brain/awh641
39. Bö L, Geurts JJG, van der Valk P, Polman C, Barkhof F. Lack of correlation between cortical demyelination and white matter pathologic changes in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2007;64(1):76-80. doi:10.1001/archneur.64.1.76
40. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2188-2197. doi:10.1056/NEJMoal100648
41. Bagnato F, Butman JA, Gupta S, et al. In vivo detection of cortical plaques by MR imaging in patients with multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27(10):2161-2167.
42. Calabrese M, Rocca MA, Atzori M, et al. Cortical lesions in primary progressive multiple sclerosis: a 2-year longitudinal MR study. *Neurology*. 2009;72(15):1330-1336. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a0fee5
43. Filippi M, Preziosa P, Pagani E, et al. Microstructural magnetic resonance imaging of cortical lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(4):418-426. doi:10.1177/1352458512457842
44. Sethi V, Yousry TA, Muhlert N, et al. Improved detection of cortical MS lesions with phase-sensitive inversion recovery MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(9):877-882. doi:10.1136/jnnp-2012-303023
45. Calabrese M, De Stefano N, Atzori M, et al. Detection of cortical inflammatory lesions by double inversion recovery magnetic resonance imaging in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2007;64(10):1416-1422. doi:10.1001/archneur.64.10.1416
46. Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(2):182-187. doi:10.1136/jnnp.2008.148767
47. Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(12):1101-1107. doi:10.1097/01.jnen.0000190067.20935.42
48. Geurts JJG, Bö L, Roosendaal SD, et al. Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(9):819-827. doi:10.1097/nen.0b013e3181461f54

49. Papadopoulos D, Dukes S, Patel R, Nicholas R, Vora A, Reynolds R. Substantial archaocortical atrophy and neuronal loss in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2009;19(2):238-253. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00177.x
50. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2007;17(1):38-44. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00041.x
51. Bø L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mørk SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(7):723-732. doi:10.1093/jnen/62.7.723
52. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015;14(2):183-193. doi:10.1016/S1474-4422(14)70256-X
53. Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C. Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2007;17(2):129-138. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00043.x
54. Strijbis EMM, Kooi EJ, van der Valk P, Geurts JGG. Cortical Remyelination Is Heterogeneous in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(5):390-401. doi:10.1093/jnen/nlx023
55. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain.* 2006;129(Pt 12):3165-3172. doi:10.1093/brain/awl217
56. Harlow DE, Honce JM, Miravalle AA. Remyelination Therapy in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2015;6:257. doi:10.3389/fneur.2015.00257
57. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol.* 1993;33(2):137-151. doi:10.1002/ana.410330203
58. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(11):839-855. doi:10.1038/nrn2480
59. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3):a028936. doi:10.1101/cshperspect.a028936
60. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology.* 2009;72(22):1914-1921. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a8260a
61. Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF. Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Mult Scler.* 1999;5(3):179-183. doi:10.1177/135245859900500307

62. Kanchandani R, Howe JG. Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982;45(4):308-312. doi:10.1136/jnnp.45.4.308
63. McAlpine D, Lumsden CE, Acheson D. *Multiple Sclerosis: A Reappraisal*. 2nd ed. Churchill Livingstone; 1972.
64. Dillon BE, Lemack GE. Urodynamics in the evaluation of the patient with multiple sclerosis: when are they helpful and how do we use them? *Urol Clin North Am*. 2014;41(3):439-444, ix. doi:10.1016/j.ucl.2014.04.004
65. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-911. doi:10.1212/wnl.46.4.907
66. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2017;389(10076):1336-1346. doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X
67. McAlpine D. Multiple sclerosis: a review. *Br Med J*. 1973;2(5861):292-295. doi:10.1136/bmj.2.5861.292
68. McDonald WI. Relapse, remission, and progression in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1486-1487. doi:10.1056/NEJM200011163432010
69. Patzold U, Pocklington PR. Course of multiple sclerosis. First results of a prospective study carried out of 102 MS patients from 1976-1980. *Acta Neurol Scand*. 1982;65(4):248-266. doi:10.1111/j.1600-0404.1982.tb03084.x
70. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302. doi:10.1002/ana.22366
71. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
72. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444
73. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
74. De Stefano N, Giorgio A, Tintoré M, et al. Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple sclerosis: MAGNIMS consensus recommendations. *Mult Scler*. 2018;24(2):214-221. doi:10.1177/1352458517717808

75. Okuda DT, Siva A, Kantarci O, et al. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014;9(3):e90509. doi:10.1371/journal.pone.0090509
76. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA*. 2021;325(8):765-779. doi:10.1001/jama.2020.26858
77. Mehmood A, Ali W, Song S, et al. Optical coherence tomography monitoring and diagnosing retinal changes in multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2021;11(10):e2302. doi:10.1002/brb3.2302
78. Wojtkowski M, Leitgeb R, Kowalczyk A, Bajraszewski T, Fercher AF. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 2002;7(3):457-463. doi:10.1117/1.1482379
79. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R. Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain*. 2010;133(Pt 6):1591-1601. doi:10.1093/brain/awq080
80. Parisi V, Manni G, Spadaro M, et al. Correlation between morphological and functional retinal impairment in multiple sclerosis patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(11):2520-2527.
81. Chen TC, Cense B, Pierce MC, et al. Spectral domain optical coherence tomography: ultra-high speed, ultra-high resolution ophthalmic imaging. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(12):1715-1720. doi:10.1001/archophth.123.12.1715
82. Syc SB, Warner CV, Hiremath GS, et al. Reproducibility of high-resolution optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(7):829-839. doi:10.1177/1352458510371640
83. Warner CV, Syc SB, Stankiewicz AM, et al. The impact of utilizing different optical coherence tomography devices for clinical purposes and in multiple sclerosis trials. *PLoS One*. 2011;6(8):e22947. doi:10.1371/journal.pone.0022947
84. Saidha S, Sotirchos ES, Ibrahim MA, et al. Microcystic macular oedema, thickness of the inner nuclear layer of the retina, and disease characteristics in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2012;11(11):963-972. doi:10.1016/S1474-4422(12)70213-2
85. Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Rostami A. Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis. *Exp Eye Res*. 2008;87(3):208-213. doi:10.1016/j.exer.2008.05.017
86. Kerrison JB, Flynn T, Green WR. Retinal pathologic changes in multiple sclerosis. *Retina*. 1994;14(5):445-451. doi:10.1097/00006982-199414050-00010

87. Ratchford JN, Saidha S, Sotirchos ES, et al. Active MS is associated with accelerated retinal ganglion cell/inner plexiform layer thinning. *Neurology*. 2013;80(1):47-54. doi:10.1212/WNL.0b013e31827b1a1c
88. Talman LS, Bisker ER, Sackel DJ, et al. Longitudinal study of vision and retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;67(6):749-760. doi:10.1002/ana.22005
89. Gabilondo I, Martínez-Lapiscina EH, Martínez-Heras E, et al. Trans-synaptic axonal degeneration in the visual pathway in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014;75(1):98-107. doi:10.1002/ana.24030
90. Costello F, Coupland S, Hodge W, et al. Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Ann Neurol*. 2006;59(6):963-969. doi:10.1002/ana.20851
91. Petzold A, Balcer LJ, Calabresi PA, et al. Retinal layer segmentation in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2017;16(10):797-812. doi:10.1016/S1474-4422(17)30278-8
92. Syc SB, Saidha S, Newsome SD, et al. Optical coherence tomography segmentation reveals ganglion cell layer pathology after optic neuritis. *Brain*. 2012;135(Pt 2):521-533. doi:10.1093/brain/awr264
93. Petzold A, Wattjes MP, Costello F, et al. The investigation of acute optic neuritis: a review and proposed protocol. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(8):447-458. doi:10.1038/nrneurol.2014.108
94. Knier B, Schmidt P, Aly L, et al. Retinal inner nuclear layer volume reflects response to immunotherapy in multiple sclerosis. *Brain*. 2016;139(11):2855-2863. doi:10.1093/brain/aww219
95. Forooghian F, Cukras C, Meyerle CB, Chew EY, Wong WT. Evaluation of time domain and spectral domain optical coherence tomography in the measurement of diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4290-4296. doi:10.1167/iovs.08-2113
96. Saidha S, Syc SB, Durbin MK, et al. Visual dysfunction in multiple sclerosis correlates better with optical coherence tomography derived estimates of macular ganglion cell layer thickness than peripapillary retinal nerve fiber layer thickness. *Mult Scler*. 2011;17(12):1449-1463. doi:10.1177/1352458511418630
97. Saidha S, Al-Louzi O, Ratchford JN, et al. Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: A four-year study. *Ann Neurol*. 2015;78(5):801-813. doi:10.1002/ana.24487
98. Seigo MA, Sotirchos ES, Newsome S, et al. In vivo assessment of retinal neuronal layers in multiple sclerosis with manual and automated optical

- coherence tomography segmentation techniques. *J Neurol*. 2012;259(10):2119-2130. doi:10.1007/s00415-012-6466-x
99. Walter SD, Ishikawa H, Galetta KM, et al. Ganglion cell loss in relation to visual disability in multiple sclerosis. *Ophthalmology*. 2012;119(6):1250-1257. doi:10.1016/j.ophtha.2011.11.032
100. Knier B, Leppenotier G, Wetzlmair C, et al. Association of Retinal Architecture, Intrathecal Immunity, and Clinical Course in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2017;74(7):847-856. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0377
101. Kupersmith MJ, Mandel G, Anderson S, Meltzer DE, Kardon R. Baseline, one and three month changes in the peripapillary retinal nerve fiber layer in acute optic neuritis: relation to baseline vision and MRI. *J Neurol Sci*. 2011;308(1-2):117-123. doi:10.1016/j.jns.2011.05.039
102. Costello F, Pan YI, Yeh EA, Hodge W, Burton JM, Kardon R. The temporal evolution of structural and functional measures after acute optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(12):1369-1373. doi:10.1136/jnnp-2014-309704
103. Gabilondo I, Martínez-Lapiscina EH, Fraga-Pumar E, et al. Dynamics of retinal injury after acute optic neuritis. *Ann Neurol*. 2015;77(3):517-528. doi:10.1002/ana.24351
104. Balk LJ, Cruz-Herranz A, Albrecht P, et al. Timing of retinal neuronal and axonal loss in MS: a longitudinal OCT study. *J Neurol*. 2016;263(7):1323-1331. doi:10.1007/s00415-016-8127-y
105. Al-Louzi OA, Bhargava P, Newsome SD, et al. Outer retinal changes following acute optic neuritis. *Mult Scler*. 2016;22(3):362-372. doi:10.1177/1352458515590646
106. Saidha S, Sotirchos ES, Oh J, et al. Relationships between retinal axonal and neuronal measures and global central nervous system pathology in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2013;70(1):34-43. doi:10.1001/jamaneurol.2013.573
107. Gelfand JM, Nolan R, Schwartz DM, Graves J, Green AJ. Microcystic macular oedema in multiple sclerosis is associated with disease severity. *Brain*. 2012;135(Pt 6):1786-1793. doi:10.1093/brain/aws098
108. Petzold A. Retinal glymphatic system: an explanation for transient retinal layer volume changes? *Brain*. 2016;139(11):2816-2819. doi:10.1093/brain/aww239
109. Abegg M, Zinkernagel M, Wolf S. Microcystic macular degeneration from optic neuropathy. *Brain*. 2012;135(Pt 12):e225. doi:10.1093/brain/aws215

110. Balk LJ, Killestein J, Polman CH, Uitdehaag BMJ, Petzold A. Microcystic macular oedema confirmed, but not specific for multiple sclerosis. *Brain*. 2012;135(Pt 12):e226; author reply e227. doi:10.1093/brain/aws216
111. Borruat FX, Dysli M, Voide N, Abegg M. Acetazolamide Reduces Retinal Inner Nuclear Layer Thickness in Microcystic Macular Edema Secondary to Optic Neuropathy. *Eur Neurol*. 2018;79(3-4):150-153. doi:10.1159/000487665
112. Barboni P, Carelli V, Savini G, Carbonelli M, La Morgia C, Sadun AA. Microcystic macular degeneration from optic neuropathy: not inflammatory, not trans-synaptic degeneration. *Brain*. 2013;136(Pt 7):e239. doi:10.1093/brain/awt014
113. Lujan BJ, Horton JC. Microcysts in the inner nuclear layer from optic atrophy are caused by retrograde trans-synaptic degeneration combined with vitreous traction on the retinal surface. *Brain*. 2013;136(Pt 11):e260. doi:10.1093/brain/awt154
114. Hanson JVM, Hediger M, Manogaran P, et al. Outer Retinal Dysfunction in the Absence of Structural Abnormalities in Multiple Sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(1):549-560. doi:10.1167/iovs.17-22821
115. You Y, Graham EC, Shen T, et al. Progressive inner nuclear layer dysfunction in non-optic neuritis eyes in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(1):e427. doi:10.1212/NXI.0000000000000427
116. Saidha S, Syc SB, Ibrahim MA, et al. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain*. 2011;134(Pt 2):518-533. doi:10.1093/brain/awq346
117. Martinez-Lapiscina EH, Arnow S, Wilson JA, et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol*. 2016;15(6):574-584. doi:10.1016/S1474-4422(16)00068-5
118. Frohman EM, Dwyer MG, Frohman T, et al. Relationship of optic nerve and brain conventional and non-conventional MRI measures and retinal nerve fiber layer thickness, as assessed by OCT and GDx: a pilot study. *J Neurol Sci*. 2009;282(1-2):96-105. doi:10.1016/j.jns.2009.04.010
119. Lampert EJ, Andorra M, Torres-Torres R, et al. Color vision impairment in multiple sclerosis points to retinal ganglion cell damage. *J Neurol*. 2015;262(11):2491-2497. doi:10.1007/s00415-015-7876-3
120. Ortiz-Perez S, Andorra M, Sanchez-Dalmau B, et al. Visual field impairment captures disease burden in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2016;263(4):695-702. doi:10.1007/s00415-016-8034-2

121. Balcer LJ, Raynowska J, Nolan R, et al. Validity of low-contrast letter acuity as a visual performance outcome measure for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(5):734-747. doi:10.1177/1352458517690822
122. Sanchez-Dalmau B, Martinez-Lapiscina EH, Torres-Torres R, et al. Early retinal atrophy predicts long-term visual impairment after acute optic neuritis. *Mult Scler.* 2018;24(9):1196-1204. doi:10.1177/1352458517718628
123. Burton JM, Eliasziw M, Trufyn J, Tung C, Carter G, Costello F. A prospective cohort study of vitamin D in optic neuritis recovery. *Mult Scler.* 2017;23(1):82-93. doi:10.1177/1352458516642315
124. Sriram P, Wang C, Yiannikas C, et al. Relationship between optical coherence tomography and electrophysiology of the visual pathway in non-optic neuritis eyes of multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2014;9(8):e102546. doi:10.1371/journal.pone.0102546
125. Hanson JVM, Lukas SC, Pless M, Schippling S. Optical Coherence Tomography in Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):177-184. doi:10.1055/s-0036-1582226
126. Coric D, Balk LJ, Verrijp M, et al. Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis is associated with atrophy of the inner retinal layers. *Mult Scler.* 2018;24(2):158-166. doi:10.1177/1352458517694090
127. Garcia-Martin E, Rodriguez-Mena D, Herrero R, et al. Neuro-ophthalmologic evaluation, quality of life, and functional disability in patients with MS. *Neurology.* 2013;81(1):76-83. doi:10.1212/WNL.0b013e318299ccd9
128. Villoslada P, Martinez-Lapiscina EH. Time is vision: The importance of the early discovery and diagnosis of optic neuritis. *Mult Scler.* 2017;23(14):1806-1807. doi:10.1177/1352458517739140
129. Oberwahrenbrock T, Ringelstein M, Jentschke S, et al. Retinal ganglion cell and inner plexiform layer thinning in clinically isolated syndrome. *Mult Scler.* 2013;19(14):1887-1895. doi:10.1177/1352458513489757
130. Wicki CA, Hanson JVM, Schippling S. Optical coherence tomography as a means to characterize visual pathway involvement in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018;31(5):662-668. doi:10.1097/WCO.0000000000000604
131. Massin P, Girach A, Erginay A, Gaudric A. Optical coherence tomography: a key to the future management of patients with diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84(4):466-474. doi:10.1111/j.1600-0420.2006.00694.x
132. Bolz M, Schmidt-Erfurth U, Deak G, et al. Optical coherence tomographic hyperreflective foci: a morphologic sign of lipid extravasation in diabetic

- macular edema. *Ophthalmology*. 2009;116(5):914-920.
doi:10.1016/j.ophtha.2008.12.039
133. Curcio CA, Zanzottera EC, Ach T, Balaratnasingam C, Freund KB. Activated Retinal Pigment Epithelium, an Optical Coherence Tomography Biomarker for Progression in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(6):BIO211-BIO226. doi:10.1167/iovs.17-21872
 134. Pang CE, Messinger JD, Zanzottera EC, Freund KB, Curcio CA. The Onion Sign in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Represents Cholesterol Crystals. *Ophthalmology*. 2015;122(11):2316-2326.
doi:10.1016/j.ophtha.2015.07.008
 135. Framme C, Wolf S, Wolf-Schnurrbusch U. Small dense particles in the retina observable by spectral-domain optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5965-5969. doi:10.1167/iovs.10-5779
 136. Uji A, Murakami T, Nishijima K, et al. Association between hyperreflective foci in the outer retina, status of photoreceptor layer, and visual acuity in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(4):710-717. doi:10.1016/j.ajo.2011.08.041
 137. Fragiotta S, Rossi T, Cutini A, Grenga PL, Vingolo EM. PREDICTIVE FACTORS FOR DEVELOPMENT OF NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: A Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Study. *Retina*. 2018;38(2):245-252.
doi:10.1097/IAE.0000000000001540
 138. Abri Aghdam K, Pielen A, Framme C, Junker B. Correlation Between Hyperreflective Foci and Clinical Outcomes in Neovascular Age-Related Macular Degeneration After Switching to Aflibercept. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6448-6455. doi:10.1167/iovs.15-17338
 139. Altay L, Scholz P, Schick T, et al. Association of Hyperreflective Foci Present in Early Forms of Age-Related Macular Degeneration With Known Age-Related Macular Degeneration Risk Polymorphisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(10):4315-4320. doi:10.1167/iovs.15-18855
 140. Borrelli E, Zuccaro B, Zucchiatti I, et al. Optical Coherence Tomography Parameters as Predictors of Treatment Response to Eplerenone in Central Serous Chorioretinopathy. *J Clin Med*. 2019;8(9):E1271.
doi:10.3390/jcm8091271
 141. Busch C, Okada M, Zur D, et al. Baseline predictors for visual acuity loss during observation in diabetic macular oedema with good baseline visual acuity. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(7):e801-e806. doi:10.1111/aos.14390

142. Chen KC, Jung JJ, Curcio CA, et al. Intraretinal Hyperreflective Foci in Acquired Vitelliform Lesions of the Macula: Clinical and Histologic Study. *Am J Ophthalmol.* 2016;164:89-98. doi:10.1016/j.ajo.2016.02.002
143. Chatziralli I, Theodossiadis P, Parikakis E, et al. Dexamethasone Intravitreal Implant in Diabetic Macular Edema: Real-Life Data from a Prospective Study and Predictive Factors for Visual Outcome. *Diabetes Ther.* 2017;8(6):1393-1404. doi:10.1007/s13300-017-0332-x
144. Chatziralli IP, Sergentanis TN, Sivaprasad S. HYPERREFLECTIVE FOCI AS AN INDEPENDENT VISUAL OUTCOME PREDICTOR IN MACULAR EDEMA DUE TO RETINAL VASCULAR DISEASES TREATED WITH INTRAVITREAL DEXAMETHASONE OR RANIBIZUMAB. *Retina.* 2016;36(12):2319-2328. doi:10.1097/IAE.0000000000001070
145. Vujosevic S, Bini S, Torresin T, et al. HYPERREFLECTIVE RETINAL SPOTS IN NORMAL AND DIABETIC EYES: B-Scan and En Face Spectral Domain Optical Coherence Tomography Evaluation. *Retina.* 2017;37(6):1092-1103. doi:10.1097/IAE.0000000000001304
146. Panozzo G, Cicinelli MV, Augustin AJ, et al. An optical coherence tomography-based grading of diabetic maculopathy proposed by an international expert panel: The European School for Advanced Studies in Ophthalmology classification. *Eur J Ophthalmol.* 2020;30(1):8-18. doi:10.1177/1120672119880394
147. Kodjikian L, Bellocq D, Bandello F, et al. First-line treatment algorithm and guidelines in center-involving diabetic macular edema. *Eur J Ophthalmol.* 2019;29(6):573-584. doi:10.1177/1120672119857511
148. Meduri A, Oliverio GW, Trombetta L, Giordano M, Inferrera L, Trombetta CJ. Optical Coherence Tomography Predictors of Favorable Functional Response in Naïve Diabetic Macular Edema Eyes Treated with Dexamethasone Implants as a First-Line Agent. *J Ophthalmol.* 2021;2021:6639418. doi:10.1155/2021/6639418
149. Deák GG, Bolz M, Kriechbaum K, et al. Effect of retinal photocoagulation on intraretinal lipid exudates in diabetic macular edema documented by optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2010;117(4):773-779. doi:10.1016/j.ophtha.2009.09.027
150. Yamada Y, Suzuma K, Fujikawa A, Kumagami T, Kitaoka T. Imaging of laser-photocoagulated diabetic microaneurysm with spectral domain optical coherence tomography. *Retina.* 2013;33(4):726-731. doi:10.1097/IAE.0b013e3182753960
151. Horii T, Murakami T, Nishijima K, et al. Relationship between fluorescein pooling and optical coherence tomographic reflectivity of cystoid spaces in

- diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2012;119(5):1047-1055.
doi:10.1016/j.ophtha.2011.10.030
152. Yoshitake S, Murakami T, Uji A, et al. Association between cystoid spaces on indocyanine green hyperfluorescence and optical coherence tomography after vitrectomy for diabetic macular oedema. *Eye (Lond)*. 2014;28(4):439-448. doi:10.1038/eye.2013.290
 153. Fehér J, Taurone S, Spoletini M, et al. Ultrastructure of neurovascular changes in human diabetic retinopathy. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018;31:394632017748841. doi:10.1177/0394632017748841
 154. Zeng H yang, Green WR, Tso MOM. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(2):227-232. doi:10.1001/archophthalmol.2007.65
 155. Lee H, Jang H, Choi YA, Kim HC, Chung H. Association Between Soluble CD14 in the Aqueous Humor and Hyperreflective Foci on Optical Coherence Tomography in Patients With Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(2):715-721. doi:10.1167/iovs.17-23042
 156. Mugisho OO, Rupenthal ID, Squirrell DM, et al. Intravitreal pro-inflammatory cytokines in non-obese diabetic mice: Modelling signs of diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202156. doi:10.1371/journal.pone.0202156
 157. Midena E, Pilotto E, Bini S. Hyperreflective Intraretinal Foci as an OCT Biomarker of Retinal Inflammation in Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(13):5366. doi:10.1167/iovs.18-25611
 158. Lee H, Chung H. Author Response: Hyperreflective Intraretinal Foci as an OCT Biomarker of Retinal Inflammation in Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(13):5367. doi:10.1167/iovs.18-25825
 159. Khanifar AA, Koreishi AF, Izatt JA, Toth CA. Drusen ultrastructure imaging with spectral domain optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2008;115(11):1883-1890. doi:10.1016/j.ophtha.2008.04.041
 160. Schuman SG, Koreishi AF, Farsiu S, Jung S ho, Izatt JA, Toth CA. Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2009;116(3):488-496.e2. doi:10.1016/j.ophtha.2008.10.006
 161. Folgar FA, Chow JH, Farsiu S, et al. Spatial correlation between hyperpigmentary changes on color fundus photography and hyperreflective foci on SDOCT in intermediate AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(8):4626-4633. doi:10.1167/iovs.12-9813

162. Madeira MH, Boia R, Santos PF, Ambrósio AF, Santiago AR. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:673090. doi:10.1155/2015/673090
163. Ma W, Zhao L, Wong WT. Microglia in the outer retina and their relevance to pathogenesis of age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2012;723:37-42. doi:10.1007/978-1-4614-0631-0_6
164. Coscas G, De Benedetto U, Coscas F, et al. Hyperreflective dots: a new spectral-domain optical coherence tomography entity for follow-up and prognosis in exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmologica.* 2013;229(1):32-37. doi:10.1159/000342159
165. Nagasaka Y, Ito Y, Ueno S, Terasaki H. Number of Hyperreflective Foci in the Outer Retina Correlates with Inflammation and Photoreceptor Degeneration in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmol Retina.* 2018;2(7):726-734. doi:10.1016/j.oret.2017.07.020
166. Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol.* 2017;149-150:1-20. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.01.002
167. Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci.* 2011;31(45):16064-16069. doi:10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011
168. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007;131(6):1164-1178. doi:10.1016/j.cell.2007.10.036
169. Wakselman S, Béchade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci.* 2008;28(32):8138-8143. doi:10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008
170. Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci.* 2012;32(43):15106-15111. doi:10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012
171. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci.* 2013;16(5):543-551. doi:10.1038/nn.3358
172. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-758. doi:10.1038/nn1472
173. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* 2016;19(8):987-991. doi:10.1038/nn.4338

174. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(12):E1738-1746. doi:10.1073/pnas.1525528113
175. Satoh J ichi, Kino Y, Asahina N, et al. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology*. 2016;36(1):39-49. doi:10.1111/neup.12235
176. Lassmann H. Pathology of inflammatory diseases of the nervous system: Human disease versus animal models. *Glia*. 2020;68(4):830-844. doi:10.1002/glia.23726
177. Bisht K, Sharma KP, Lecours C, et al. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia*. 2016;64(5):826-839. doi:10.1002/glia.22966
178. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016;353(6301):777-783. doi:10.1126/science.aag2590
179. Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 2014;124(5):307-321. doi:10.3109/00207454.2013.833510
180. Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. The relation between α -synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments. *Neuroscience*. 2015;302:47-58. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.008
181. Cooper-Knock J, Green C, Altschuler G, et al. A data-driven approach links microglia to pathology and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):23. doi:10.1186/s40478-017-0424-x
182. Lall D, Baloh RH. Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3250-3258. doi:10.1172/JCI90607
183. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019;365(6460):eaav7188. doi:10.1126/science.aav7188
184. van Horssen J, Singh S, van der Pol S, et al. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflammation*. 2012;9:156. doi:10.1186/1742-2094-9-156
185. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H. Loss of "homeostatic" microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(7):1900-1913. doi:10.1093/brain/awx113

186. Dong Y, Yong VW. When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(12):704-717. doi:10.1038/s41582-019-0253-6
187. Schettters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango. *Front Immunol*. 2017;8:1905. doi:10.3389/fimmu.2017.01905
188. Heppner FL, Greter M, Marino D, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*. 2005;11(2):146-152. doi:10.1038/nm1177
189. Voss EV, Škuljec J, Gudi V, et al. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):519-528. doi:10.1016/j.nbd.2011.09.008
190. van der Poel M, Ulas T, Mizze MR, et al. Transcriptional profiling of human microglia reveals grey-white matter heterogeneity and multiple sclerosis-associated changes. *Nat Commun*. 2019;10(1):1139. doi:10.1038/s41467-019-08976-7
191. University of California, San Francisco MS-EPIC Team, Cree BAC, Hollenbach JA, et al. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2019;85(5):653-666. doi:10.1002/ana.25463
192. Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. *Nature*. 2021;597(7878):709-714. doi:10.1038/s41586-021-03892-7
193. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain- from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(1):44-53. doi:10.1038/nrneurol.2012.227
194. Pilotto E, Mian S, Torresin T, et al. Hyperreflective Foci in the Retina of Active Relapse-Onset Multiple Sclerosis. *Ophthalmology*. 2020;127(12):1774-1776. doi:10.1016/j.ophtha.2020.03.024
195. Pengo M, Mian S, Franciotta S, et al. Retinal Hyperreflecting Foci Associate With Cortical Pathology in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;9(4):e1180. doi:10.1212/NXI.0000000000001180
196. Puthenparampil M, Torresin T, Franciotta S, et al. Hyper-Reflecting Foci in Multiple Sclerosis Retina Associate With Macrophage/Microglia-Derived Cytokines in Cerebrospinal Fluid. *Front Immunol*. 2022;13:852183. doi:10.3389/fimmu.2022.852183
197. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies

- against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992;356(6364):63-66.
doi:10.1038/356063a0
198. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):899-910. doi:10.1056/NEJMoa044397
199. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):911-923. doi:10.1056/NEJMoa044396
200. van Pesch V, Sindic CJ, Fernández O. Effectiveness and safety of natalizumab in real-world clinical practice: Review of observational studies. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016;149:55-63. doi:10.1016/j.clineuro.2016.07.001
201. Butzkueven H, Kappos L, Wiendl H, et al. Long-term safety and effectiveness of natalizumab treatment in clinical practice: 10 years of real-world data from the Tysabri Observational Program (TOP). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(6):660-668. doi:10.1136/jnnp-2019-322326
202. Ryerson LZ, Foley J, Chang I, et al. Risk of natalizumab-associated PML in patients with MS is reduced with extended interval dosing. *Neurology*. 2019;93(15):e1452-e1462. doi:10.1212/WNL.00000000000008243
203. Calabresi PA, Giovannoni G, Confavreux C, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*. 2007;69(14):1391-1403. doi:10.1212/01.wnl.0000277457.17420.b5
204. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Petersen T, Ravnborg M, Oturai A, Sellebjerg F. Recurrence or rebound of clinical relapses after discontinuation of natalizumab therapy in highly active MS patients. *J Neurol*. 2014;261(6):1170-1177. doi:10.1007/s00415-014-7325-8
205. González-Suarez I, Rodríguez de Antonio L, Orviz A, et al. Catastrophic outcome of patients with a rebound after Natalizumab treatment discontinuation. *Brain Behav*. 2017;7(4):e00671. doi:10.1002/brb3.671
206. Larochelle C, Metz I, Lécuyer MA, et al. Immunological and pathological characterization of fatal rebound MS activity following natalizumab withdrawal. *Mult Scler*. 2017;23(1):72-81. doi:10.1177/1352458516641775
207. Rasenack M, Derfuss T. Disease activity return after natalizumab cessation in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(5):587-594. doi:10.1586/14737175.2016.1168295
208. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66(9):1144-1150. doi:10.1001/archneurol.2009.174

209. Roosendaal SD, Moraal B, Pouwels PJW, et al. Accumulation of cortical lesions in MS: relation with cognitive impairment. *Mult Scler*. 2009;15(6):708-714. doi:10.1177/1352458509102907
210. Calabrese M, Rocca MA, Atzori M, et al. A 3-year magnetic resonance imaging study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;67(3):376-383. doi:10.1002/ana.21906
211. Rinaldi F, Calabrese M, Seppi D, Puthenparampil M, Perini P, Gallo P. Natalizumab strongly suppresses cortical pathology in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(12):1760-1767. doi:10.1177/1352458512447704
212. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, et al. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):254-260. doi:10.1016/S1474-4422(09)70021-3
213. Puthenparampil M, Cazzola C, Zywicki S, et al. NEDA-3 status including cortical lesions in the comparative evaluation of natalizumab versus fingolimod efficacy in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756286418805713. doi:10.1177/1756286418805713
214. Klaver R, De Vries HE, Schenk GJ, Geurts JJG. Grey matter damage in multiple sclerosis: a pathology perspective. *Prion*. 2013;7(1):66-75. doi:10.4161/pri.23499
215. Magraner M, Coret F, Casanova B. The relationship between inflammatory activity and brain atrophy in natalizumab treated patients. *Eur J Radiol*. 2012;81(11):3485-3490. doi:10.1016/j.ejrad.2012.01.028
216. Sastre-Garriga J, Tur C, Pareto D, et al. Brain atrophy in natalizumab-treated patients: A 3-year follow-up. *Mult Scler*. 2015;21(6):749-756. doi:10.1177/1352458514556300
217. Sucksdorff M, Tuisku J, Matilainen M, et al. Natalizumab treatment reduces microglial activation in the white matter of the MS brain. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6(4):e574. doi:10.1212/NXI.0000000000000574
218. Kaunzner UW, Kang Y, Monohan E, et al. Reduction of PK11195 uptake observed in multiple sclerosis lesions after natalizumab initiation. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;15:27-33. doi:10.1016/j.msard.2017.04.008
219. Ratchford JN, Endres CJ, Hammoud DA, et al. Decreased microglial activation in MS patients treated with glatiramer acetate. *J Neurol*. 2012;259(6):1199-1205. doi:10.1007/s00415-011-6337-x

220. Sucksdorff M, Rissanen E, Tuisku J, et al. Evaluation of the Effect of Fingolimod Treatment on Microglial Activation Using Serial PET Imaging in Multiple Sclerosis. *J Nucl Med*. 2017;58(10):1646-1651. doi:10.2967/jnumed.116.183020
221. Bunai T, Terada T, Kono S, et al. Neuroinflammation following disease modifying therapy in multiple sclerosis: A pilot positron emission tomography study. *J Neurol Sci*. 2018;385:30-33. doi:10.1016/j.jns.2017.12.004
222. Hagens MH, Killestein J, Yaqub MM, et al. Cerebral rituximab uptake in multiple sclerosis: A 89Zr-immunoPET pilot study. *Mult Scler*. 2018;24(4):543-545. doi:10.1177/1352458517704507
223. Grebing M, Nielsen HH, Fenger CD, et al. Myelin-specific T cells induce interleukin-1beta expression in lesion-reactive microglial-like cells in zones of axonal degeneration. *Glia*. 2016;64(3):407-424. doi:10.1002/glia.22937
224. Beckers L, Ory D, Geric I, et al. Increased Expression of Translocator Protein (TSPO) Marks Pro-inflammatory Microglia but Does Not Predict Neurodegeneration. *Mol Imaging Biol*. 2018;20(1):94-102. doi:10.1007/s11307-017-1099-1
225. Cleary PA, Beck RW, Anderson MM, Kenny DJ, Backlund JY, Gilbert PR. Design, methods, and conduct of the Optic Neuritis Treatment Trial. *Control Clin Trials*. 1993;14(2):123-142. doi:10.1016/0197-2456(93)90015-6
226. Hodel J, Outteryck O, Bocher AL, et al. Comparison of 3D double inversion recovery and 2D STIR FLAIR MR sequences for the imaging of optic neuritis: pilot study. *Eur Radiol*. 2014;24(12):3069-3075. doi:10.1007/s00330-014-3342-3
227. Hadhoum N, Hodel J, Defoort-Dhellemmes S, et al. Length of optic nerve double inversion recovery hypersignal is associated with retinal axonal loss. *Mult Scler*. 2016;22(5):649-658. doi:10.1177/1352458515598021
228. Tewarie P, Balk L, Costello F, et al. The OSCAR-IB consensus criteria for retinal OCT quality assessment. *PLoS One*. 2012;7(4):e34823. doi:10.1371/journal.pone.0034823
229. Aytulun A, Cruz-Herranz A, Aktas O, et al. APOSTEL 2.0 Recommendations for Reporting Quantitative Optical Coherence Tomography Studies. *Neurology*. 2021;97(2):68-79. doi:10.1212/WNL.00000000000012125
230. Frizziero L, Parrozzani R, Midena G, et al. HYPERREFLECTIVE INTRARETINAL SPOTS IN RADIATION MACULAR EDEMA ON SPECTRAL DOMAIN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. *Retina*. 2016;36(9):1664-1669. doi:10.1097/IAE.0000000000000986

