

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
SUBTIPOS CLÍNICOS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA	7
EPIDEMIOLOGIA DA EM – INTERPRETAÇÃO PARA A ETIOLOGIA	10
ETIOLOGIA AMBIENTAL	11
EVIDÊNCIAS PARA A ETIOLOGIA AMBIENTAL.....	14
<i>Vitamina D</i>	19
<i>Infecções Virais</i>	22
<i>Tabagismo</i>	25
ETIOLOGIA GENÉTICA.....	27
EVIDÊNCIAS PARA A ETIOLOGIA GENÉTICA	29
<i>Estudos Familiares</i>	29
<i>Estudos Genéticos</i>	32
DOENÇA MULTIFACTORIAL.....	41
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

Introdução: A Esclerose Múltipla é uma doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central, imuno-mediada e crónica, altamente incapacitante, que afecta mais de 1 milhão de pessoas em todo o mundo. Os diversos estudos epidemiológicos realizados ao longo dos anos têm fornecido indícios sobre a sua possível etiologia, mas nunca de uma forma assertiva.

Objectivos: Realização de uma actualização de conceitos e conhecimentos na área da patogénese da Esclerose Múltipla, abordando os mais recentes e relevantes dados epidemiológicos (factores genéticos e ambientais) e como a sua interpretação nos ajuda a compreender as diversas dimensões desta patologia, no sentido de encontrar novas armas terapêuticas.

Desenvolvimento: Vários factores ambientais e genéticos têm sido descritos como possíveis agentes etiopatogénicos mas a variedade fenotípica, genética e imunológica que caracterizam esta doença, tornam a sua abordagem complexa.

Conclusões: Os dados decorrentes dos estudos epidemiológicos são fundamentais para a compreensão da Esclerose Múltipla. A heterogeneidade que a caracteriza parece dever-se a interacções multifactoriais entre um componente poligénico e factores ambientais como a Vitamina D e o Vírus Epstein-Barr.

ABSTRACT

Introduction: Multiple Sclerosis is a demyelinating, imuno-mediated, chronic disease of the central nervous system, highly disabling, affecting more than one million of people worldwide. All over the years, several epidemiologic studies have been providing clues about its aetiology, but never in an assertive way.

Aims: In this review, we look forward to update concepts and acquirements in Multiple Sclerosis pathogenesis, addressing the novel and most relevant epidemiologic data (both genetics and environmental factors) and how its reading lead us to understand the multiple dimensions of this disease, aiming new therapeutic weapons.

Development: Both genetic and environmental factors have been implied as potencial etiopathogenic agents, but its phenotipic, genetic and immunologic variety, becomes a difficult task.

Conclusions: Epidemiological studies are crucial to understand Multiple Sclerosis. The heterogeneity that characterizes it seems to be due to multifactorial interactions between a polygenic component and environmental factors such as Vitamin D and Epstein-Barr virus.

Palavras-Chave: Esclerose Múltipla, Epidemiologia, factores ambientais, factores genéticos, susceptibilidade;

Nota: Esta tese não se encontra redigida segundo o novo Acordo Ortográfico para a Língua Portuguesa.

INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crónica, adquirida, neurodegenerativa e imuno-mediada do Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizada classicamente por surtos e remissões, constituindo actualmente a maior causa não traumática de incapacidade no jovem adulto.

Esta potencial e progressiva incapacidade conduz a consequências socioeconómicas consideráveis apesar de uma prevalência limitada, estimada em 83 por 100000 para a população europeia, nas últimas três décadas. As frequências são mais elevadas nos países nórdicos e existe uma razão sexo feminino/masculino de aproximadamente 2,0. A incidência europeia ronda 4,3/ano/100.000 habitantes, prevendo-se um aumento significativo nas próximas décadas (Pugliatti et al., 2006).

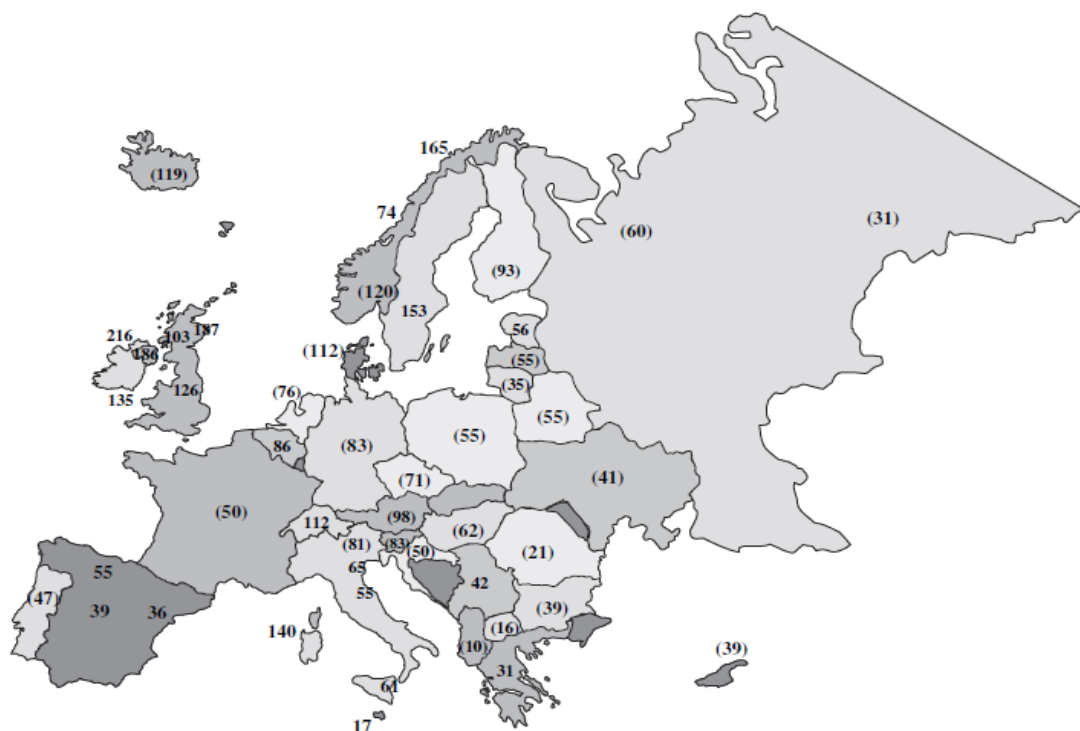


Figura 1. Taxas de prevalência europeias da EM (retirado de Pugliatti et al., 2006).

A verdadeira situação epidemiológica da EM em Portugal é desconhecida. O único estudo epidemiológico disponível até à data remete-se ao distrito de Santarém, onde se verificou uma prevalência de 46,3/100000 habitantes (De Sá et al., 2006).

Clinicamente manifesta-se por sinais de disfunção neurológica focal (como nevrite óptica, desequilíbrio, fraqueza muscular, descontrolo dos esfíncteres) e outros sintomas, como fadiga (presente em cerca de 80% dos pacientes), espasticidade, dor, tremor, ataxia, depressão e mesmo alterações cognitivas, que acabam por influenciar a capacidade para as Actividades de Vida Diárias e a produtividade, independentemente do grau de incapacidade ou do curso da doença.

Existem evidências de se tratar de uma doença auto-imune dirigida aos constituintes da bainha de mielina do SNC, condicionando uma desmielinização e degeneração axonal, contudo, a sua etiologia é ainda desconhecida. Factores genéticos e ambientais (como infecções - EBV, HHV-6, stress físico e emocional, clima e dieta - Vitamina D) têm sido investigados como possíveis candidatos epidemiológicos. Alguns autores defendem a existência de um componente poligénico hereditário que interage com uma multiplicidade de factores ambientais (Baranzini et al., 2009).

Os estudos geoepidemiológicos da EM têm contribuído nesta pesquisa, desvendando variações temporo-espaciais determinantes no risco de doença e mais recentemente o avanço das técnicas genéticas permitiram o desenvolvimento de novos tipos de estudos genéticos como os Genome Wide Association Studies (GWAS) que permitiram a identificação de vários *loci* associados a uma maior susceptibilidade para a Esclerose Múltipla.

Até à data, apenas algumas características são comuns na maioria dos pacientes com Esclerose Múltipla: presença de inflamação, desmielinização e perda axonal no SNC e detecção de bandas oligoclonais IgG no líquido cefalo-raquídeo (LCR), em mais de 95% dos

pacientes com EM (Ramagopalan et al., 2010), não existindo ainda um teste diagnóstico fidedigno disponível, pelo que o diagnóstico de EM assenta essencialmente em critérios clínicos e imagiológicos, eventualmente apoiados pela Imunoelectroforese do LCR e nos Potenciais Evocados Visuais (Disanto et al., 2010)

Este trabalho tem como objectivo uma revisão dos estudos mais relevantes nesta área, para compreender como a Epidemiologia pode ajudar na compreensão da etiologia da EM. A abordagem dos artigos mais recentes é imperativa para auxiliar este percurso. O conhecimento da etiopatogénese é fundamental para a pesquisa meios de complementares de diagnóstico fiáveis e terapêuticas verdadeiramente eficazes na EM.

SUBTIPOS CLÍNICOS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla é caracterizada por um grande espectro clínico, podendo ir desde pacientes com um incómodo sensorial ocasional a um curso fulminante da doença, fatal após alguns meses do início clínico. Existem também algumas afecções neurológicas, consideradas variantes da EM, que podem evoluir mais tarde para uma EM clássica (Disanto et al., 2010). Pode ser assintomática ou sintomática e nesta última, pode apresentar-se com uma evolução clínica recidivante ou severamente progressiva.

a) *Esclerose Múltipla Clássica.* Cerca de 85% dos pacientes, iniciam um síndrome clínico isolado, desenvolvendo mais tarde um padrão de surto-remissão (EMSR), com exacerbações agudas seguidas de períodos de remissão da sintomatologia. Com o tempo, após cada episódio de surto, a recuperação neurológica torna-se incompleta, com incapacidade persistente. Cerca de 70-80% dos casos de EMSR evoluem para a forma progressiva secundária (EMSP).

À volta de 15% dos doentes com EM, apresentam uma forma progressiva primária (EMPP), caracterizada por um curso clínico progressivo desde a instalação clínica da doença.

Por fim, um pequeno grupo de pacientes exhibe uma forma progressiva recidivante (EMPR), onde após as exacerbações ocorre pouca ou nenhuma recuperação neurológica, instalando-se uma incapacidade gradual.

Contudo, o curso desta doença é muitas vezes inesperado, mesmo dentro destes subgrupos clínicos. Os casos de EMSR podem variar desde formas leves, onde se mantêm com incapacidade mínima durante um período superior a 20 anos, desde o início do quadro sintomático, até formas rapidamente progressivas, com instalação de uma progressão secundária em poucos anos (EM maligna) (Scalfari et al., 2010). Além disso, na forma progressiva secundária da EM, a evolução da incapacidade pode dever-se por insucesso da

recuperação neurológica após os surtos ou a uma progressão clínica sem identificação dos surtos (EMPS não recidivante).

Apesar da variabilidade clínica verifica-se que os pacientes com doença de evolução benigna, durante um período superior a 10 anos ou mais, mantêm uma clínica mais estável e não-progressiva, mas o desenlace de uma EM de longa duração clínica mantém-se imprevisível (Pittock et al., 2004).

b) *Variantes da EM.* Existem condições clínicas semelhantes à forma clássica de EM, não sendo ainda claro se isto se deve à presença de mecanismos etiopatogénicos comuns.

A Neuromielite Óptica (NMO) ou *Doença de Devic*, considerada até há pouco tempo como uma variante da EM, assume-se actualmente como uma entidade patológica desmielinizante grave do SNC, que afecta especialmente a espinhal medula e o nervo óptico (Kira et al, 2008), caracterizada pela presença de um anticorpo específico, anti-aquaporina 4, que se manifesta pela diminuição da imunoreactividade da aquaporina 4 nas lesões de NMO.

A variante *Marburg* da EM é caracterizada por uma desmielinização fulminante, com perda axonal acentuada conduzindo rapidamente a uma incapacidade extrema, por vezes fatal.

A *Esclerose Concêntrica de Baló* também apresenta um curso semelhante à EM, sendo patognomónica a presença de lesões detectadas na RMN, com anéis concêntricos de desmielinização e tecido normal.

A *Doença de Schilder* é uma afecção desmielinizante, típica das crianças, apresentando lesões da substância branca, grandes e confluentes.

A heterogeneidade clínica e a imprevisibilidade na evolução da EM, dentro dos seus subgrupos clínicos, revelam uma variedade fenotípica enorme, evidenciando as lacunas existentes na compreensão desta patologia.

EM Clássica	EM Variantes
1) Surto – Remissão (EMSR): 85% de todos os casos no início do quadro clínico;	Esclerose Concêntrica de Balo
2) Progressiva Secundária (EMPS): 70 – 80% dos casos de EMSR após 10 anos do início da sintomatologia;	EM Variante Margburg
3) Progressiva Primária (EMPP): 15% de todos os casos no início do quadro clínico;	EM Variante Schilder
4) Progressiva Recidivante (EMPR): pequena percentagem;	

Tabela 1. EM Clássica e suas variantes (adaptado de Disanto et al., 2010)

EPIDEMIOLOGIA DA EM – INTERPRETAÇÃO PARA A ETIOLOGIA

Apesar dos diversos dados epidemiológicos dos últimos 70 anos, qualquer tentativa de redefinir o padrão de distribuição geográfica desta EM revela-se um desafio permanente.

A comparação de estudos de prevalência de áreas geográficas diferentes e em intervalos cronológicos distintos acarreta uma série de problemas como a variabilidade na vigilância populacional no que toca ao tamanho, à pirâmide etária, origem étnica e composição das populações em estudo, o uso de critérios diagnósticos diferentes e a variabilidade interobservador na sua aplicação, a extensão da doença e o reconhecimento de casos benignos ou de estádios precoces da EM que dependem do acesso aos cuidados de saúde, da experiência médica local, do número de Neurologistas, da disponibilidade e acessibilidade a novos meios de diagnóstico, do conhecimento público da EM e ainda dos recursos dos investigadores.

Os estudos epidemiológicos mais recentes têm tentado ultrapassar algumas destas limitações, evitando enviesamentos e utilizando amostras populacionais mais significativas para a obtenção de dados estatísticos mais realistas.

ETIOLOGIA AMBIENTAL

Um caso paradigmático da distribuição temporo-espacial desta doença, alvo de inúmeros estudos ocorreu nas ilhas Faroé, uma região semi-independente do Reino da Dinamarca, em 1943. Não existem provas de casos descritos de EM ocorridos entre nativos destas ilhas no século XX, antes de Julho de 1943. As Ilhas Faroé foram ocupadas pelas tropas britânicas durante 5 anos, na Segunda Grande Guerra Mundial, de Abril de 1940 a Setembro de 1945, intervalo em que se verificou uma mudança na incidência anual da EM de 0 para cerca de 10,5/100.000. Segundo Kurtzke et al., 2000, existe uma relação entre a localização dos acampamentos das tropas britânicas nas Ilhas Faroé e a residência dos habitantes que desenvolveram EM nesta altura. Assim conclui-se que as tropas britânicas poderão ter transportado a EM para as ilhas e para os seus habitantes entre 1941 e 1944. Kurtzke acredita que as tropas britânicas trouxeram algo para as Faroé (infecção ou toxina), que se disseminou nas ilhas a partir de 1941 e que mais tarde resultou numa “epidemia” de EM sintomática nos habitantes insulares. O autor suspeita de uma infecção latente, pois levou cerca 2 anos a ser transmitida à população residente.

Neste estudo geoepidemiológico é definida uma afecção primária da EM (APEM), considerando-a uma doença transmissível entre as pessoas, devido a uma infecção específica, afectando uma pequena percentagem de pessoas e com a necessidade de exposição prolongada para adquirir esta APEM. A susceptibilidade para a APEM atinge os indivíduos entre os 11 – 45 anos, mas a sua transmissibilidade está limitada a um período cronológico inferior ao da idade média do início da clínica da EM, que no caso dos habitantes das ilhas Faroé encontrava-se entre os 13 e os 26 anos. A EM sintomática não é transmissível, apenas o é a APEM.

Este estudo foi alvo de várias críticas, sobretudo relativamente à interpretação, recolha de dados e acuidade diagnóstica ao longo das décadas em que estes clusters de EM ocorreram. Contudo, levanta uma hipótese infecciosa, de um agente (vírico, bacteriológico, fúngico ou parasita) com características específicas no seu tropismo e faixa etária de actuação, constituindo um estudo vector que conduziu a inúmeras investigações posteriores para apurar um agente promotor de EM. Este trabalho aborda a ideia de transmissibilidade de um agente mas que não é suficiente, sendo necessária uma susceptibilidade intrínseca de cada indivíduo para desencadear clinicamente a EM.

Num estudo sobre as taxas de prevalência da EM para populações caucasóides da Austrália e Nova Zelândia (onde foi excluída a população aborígine), foi sugerido um efeito da latitude na distribuição da doença, na ausência de gradientes raciais aparentes (Miller et al., 1990), o que poderia implicar um ou vários factores ambientais na génese desta patologia do SNC. Na Austrália, a taxa de prevalência mais alta verificada nas comunidades maioritariamente originárias do Reino Unido e Irlanda, não ultrapassava muito cerca de metade da frequência observada na maioria das Ilhas Britânicas, reflectindo a importância do ambiente na modificação do risco para a EM entre os indivíduos do mesmo grupo étnico. Na Nova Zelândia, o aparente e inesperado gradiente sul - norte verificado neste estudo, poderá ser explicado pelos antepassados Maori em mais de 50% dos caucasóides que vivem no norte da ilha.

Actualmente é aceite entre a comunidade científica que a migração de áreas de alto risco de EM para áreas de baixo risco diminui a probabilidade de desenvolver EM se a migração ocorrer antes dos 15 anos de idade, adquirindo o risco de EM da população geral da área para onde migrou, verificando-se o inverso quando se migra de uma área de baixo risco para uma de alto risco para a EM (Dean et al, 1971). Esta observação poderá ser a favor da

existência de um factor que actue antes dos 15 anos, passível de modificar a susceptibilidade para a EM.

Estes estudos sugerem uma etiologia ambiental e levam a reflectir se o risco de desenvolver EM é estabelecido na adolescência, como aliás já tinha sido sugerido por Kurtzke, período de vida do início da actividade sexual para muitos indivíduos. Em 2002, Hawkes estabelece a associação entre a chegada das tropas britânicas às Ilhas Faroé com a “epidemia” e os clusters de EM observados então, interpretando-os como resultado dos contactos sociais, nomeadamente casamentos entre habitantes das Faroé e militares britânicos. Deste modo, a transmissão sexual de um agente infeccioso, que teve como veículo os soldados das tropas britânicas torna-se uma possibilidade etiológica. Para esta teoria ser válida, teremos de assumir que houve efectivamente contacto sexual entre as tropas e os habitantes das Faroé, alguns dos quais envolvendo raparigas com menos de 16 anos. O mesmo também se verificou noutras regiões do planeta, em que ocorreu um influxo de tropas e conseqüente aumento dos casos de EM, como na Islândia, Orkneys, Shetlands, Sitka, Macomer e até no Japão. Esta presunção é uma das limitações deste estudo, muito criticado, sendo que desde então não surgiram mais estudos a defender a hipótese etiológica de uma infecção de transmissão sexual associada à EM.

EVIDÊNCIAS PARA A ETIOLOGIA AMBIENTAL

A distribuição geográfica da EM sugere uma relação entre a prevalência e a latitude, um fenómeno que tem sido exaustivamente estudado e relacionado com diversas condições – migração, exposição solar, alimentação, etc.

Um estudo recente realizado em França, veio reforçar esta relação entre a latitude e a prevalência da EM, colhendo informações de uma população não – migratória francesa, especificamente agricultores e suas famílias, através de dados do seu sistema de saúde. A prevalência da EM descreve efectivamente um gradiente norte – sul inequívoco, estando inversamente relacionada com a exposição solar (Vukusic et al., 2007).

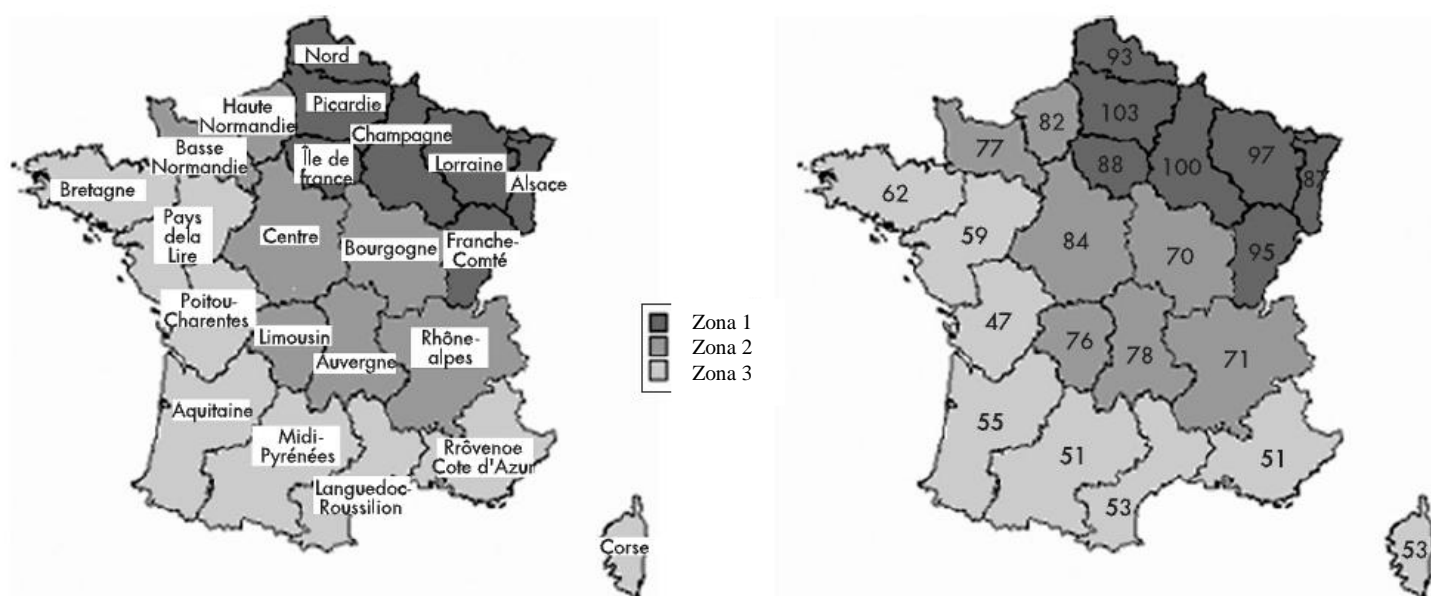


Figura 2. Distribuição da prevalência regional da EM a 1 de Janeiro de 2003, por 100000 habitantes, na população de agricultores franceses e suas famílias (adaptado de Vukusic et al., 2007).

A identificação destes factores ambientais tem sido difícil, dada a complexidade desta patologia, mas ao longo dos anos têm surgido cada vez mais evidências científicas de vários candidatos (Tabela 2).

<i>Factor Ambiental</i>	<i>Mecanismo Implicado</i>
Vitamina D	Os níveis de Vitamina D a que estamos sujeitos <i>in útero</i> poderão estar envolvidos no desenvolvimento posterior de vários sistemas de órgãos, nomeadamente o SNC (McGrath et al., 2004); durante a vida esta vitamina tem claramente funções de imuno – modulação (Ramagolapan et al., 2009)
Vírus Epstein-Barr	A expansão clonal de linfócitos B no SNC (Serafini et al., 2007) ou a infecção por EBV poderá activar uma reacção de auto – imunidade por mímica molecular (Lang et al., 2002)
Tabagismo	Desmielinização mediada pelo óxido nítrico (Smith et al., 1999) ou efeitos epigenéticos (Pembrey et al., 2006)
Hormonas Sexuais e/ou Contraceptivos Orais	Reactividade antigénica alterada (Whitacre et al., 2001) ou tolerância (Hince et al., 2008)
Stress	Desregulação do eixo hipotálamo – hipófise – supra-renal (Fassbender et al., 1998)
Infecções do Tracto Respiratório	Desencadeante imunológico de desmielinização inflamatória (Souberbielle et al., 1995)
Solventes Orgânicos	Alterações da Barreira Hemato – Encefálica (Juntunen et al., 1982)
Dieta	Suplementação de Vitamina D por óleos de peixe (Kampman et al., 2007)

Tabela 2. Factores ambientais possivelmente envolvidos na etiopatogénese da EM e potenciais mecanismos implicados (adaptado de Handel et al., 2010).

Estes factores ambientais poderão estar envolvidos na mudança da susceptibilidade para a EM em qualquer período da vida, desde o período de concepção intra-uterina até ao principiar da clínica desta doença (Tabela 3).

Os factores ambientais mais estudados e de maior consenso na comunidade científica na actualidade são os níveis séricos de Vitamina D, condicionados quer pela exposição solar quer pela dieta, a infecção por vírus Epstein-Barr (EBV) e o tabagismo.

Factos Epidemiológicos	Factor Ambiental	Evidências do factor implicado
<i>Período Pré e Peri – Natal</i>		
Origem Materna (Hoppenbrouwers et al., 2008)	Vitamina D, EBV	Influência do mês de nascimento na EM (Willer et al., 2005)
Concordância na similaridade de idade de início da EM menor em irmãos do que em gémeos dizigóticos (Willer et al., 2003)	Vitamina D, EBV	Transmissão materna ao feto pode ocorrer (Avgil et al., 2006)
<i>Infância e Adolescência</i>		
Estudos de Migração (Dean et al., 1971)	Vitamina D	Exposição solar na infância associada a menor risco de EM (Van der Mei et al., 2003)
Puberdade precoce altera o risco de EM (Ramagopalan et al., 2007)	Vitamina D	Grande diminuição do risco de EM associada á exposição solar em indivíduos com menos de 20 anos (Munger et al., 2006)

Conjunto de clusters em pacientes na infância (Riise et al., 1991)	EBV	Aumento precoce de Anticorpos contra EBV nos pacientes com EM (Levin et al., 2005)
Idade Adulta		
Idade de inicio variável (Confavreux et al., 2006)	Vitamina D	Ocupações ao ar livre e suplementação com Vitamina D associado a diminuição do risco de EM (Kampman et al., 2007)
Idade de inicio variável (Confavreux et al., 2006)	EBV	Mononucleose Infecciosa em indivíduos com mais de 15 anos associada a maior risco de EM (Hernan et al., 2001)
Idade de inicio variável (Confavreux et al., 2006)	Infecção Viral	Infecções do tracto respiratório associadas a maior risco de 1º episódio clínico de EM (Kriesel et al., 2005)
Idade de inicio variável (Confavreux et al., 2006)	Tabagismo	Fumar está associado a maior risco de EM (Hernan et al., 2005)
Após início de EM		
Variabilidade das taxas de surtos com o mês (Tremlett et al., 2008)	Vitamina D	Variabilidade das taxas de surtos com o mês, intensidade UV e níveis de Vitamina D (Tremlett et al., 2008)
Variabilidade das taxas de surtos com o mês (Tremlett et al., 2008)	Infecção Viral	Alta imunorreactividade contra EBV e infecções do Tracto Respiratório associado a maior

		risco de novo surto (Tremlett et al., 2008)
Variabilidade das taxas de surtos com o mês (Tremlett et al., 2008)	Tabagismo	Fumar está associado a maior risco de conversão em doença progressiva (Pittas et al., 2009)

Tabela 3. Influência dos diversos factores ambientais nos diferentes períodos de vida e da EM (adaptado de Handel et al., 2010); EBV – Virus Epstein – Barr.

VITAMINA D

O elo que se tem estabelecido entre a exposição solar e a EM desde há vários anos deve-se sobretudo ao padrão específico de distribuição da prevalência desta doença, descrevendo um gradiente norte – sul, como referido anteriormente. Alterações nas concentrações de Vitamina D têm surgido como um dos candidatos principais associados à patogénese e ao aumento da susceptibilidade para EM.

No referido estudo epidemiológico francês de Vukusic et al. de 2007, quando comparada a distribuição da prevalência da EM com a intensidade da luz solar no final do Verão em cada região, parece existir uma relação evidente entre elas (Figura 3).

Este gradiente de aumento do risco da EM com o aumento da latitude, que se verifica nos dois hemisférios é coincidente com a exposição solar anual e a frequente deficiência em Vitamina D (Hayes et al., 1997).

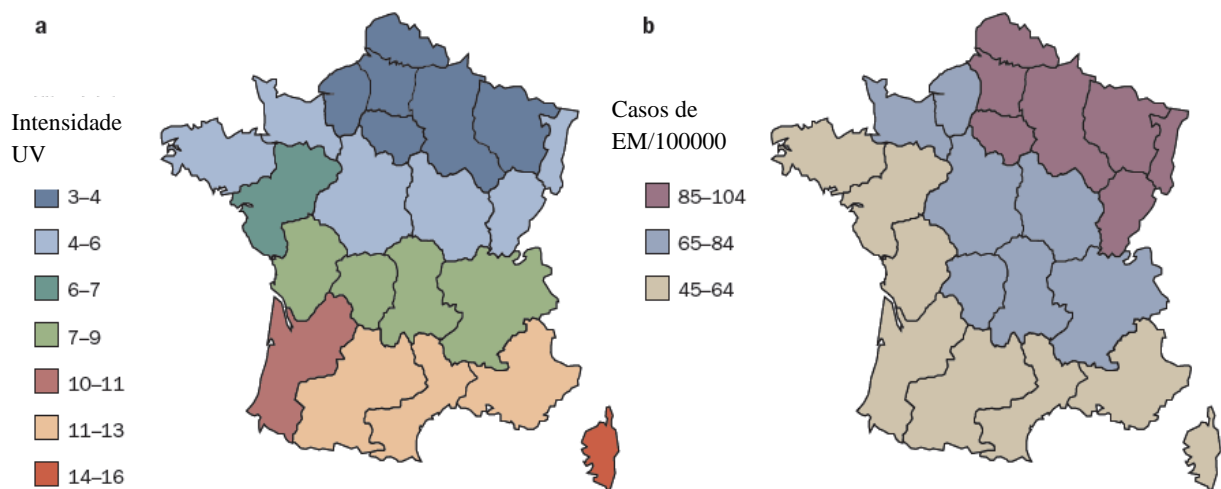


Figura 3. Intensidade da luz solar regional no final do Verão (a) e a distribuição da prevalência da EM (b) (adaptado de Handel et al., 2010).

A 25 – hidroxivitamina D [25(OH)D] é o principal metabolito da vitamina D e é a melhor medida laboratorial para verificar as concentrações séricas desta (Hollis et al., 1996).

A manutenção de concentrações séricas ótimas de 25(OH)D é importante para um bom funcionamento do sistema imunitário e está relacionado com risco de doença (Smolders et al., 2008). Estas são influenciadas sobretudo pela exposição solar à radiação ultravioleta B (UVB) mas alguns autores apontam a existência de factores genéticos a condicionar estas concentrações (Hunter et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram uma relação entre baixas concentrações séricas de [25(OH)D] em pacientes com EM, alterações sazonais na data de nascimento dos pacientes com EM (Willer et al., 2005) e variações da actividade da doença relacionadas com a sazonalidade das concentrações de 25(OH)D (Auer et al., 2000). A exposição solar relacionada com actividade ao ar livre apresenta também uma correlação inversa com o risco de desenvolver EM (Kampman et al., 2007).

Um estudo recente realizado em França, veio corroborar uma vez mais esta associação, sugerindo que a radiação UVB regional é preditiva para as taxas de prevalência da EM, encontrando também evidências de que poderá existir um potencial papel desta exposição à UVB nas diferenças específicas encontradas entre o sexo feminino e masculino nesta doença (Orton et al, 2011).

O aporte da vitamina D através da dieta e a alta concentração sérica desta na idade adulta parecem ter um efeito modesto na redução do risco de desenvolver EM (Munger et al., 2006), contudo um estudo de Wingerchuk et al., 2005 apresentou resultados promissores na redução da taxa de novos surtos em pacientes com EMSR e Kampman et al., em 2007, demonstrou que o suplemento de óleo de fígado de bacalhau pode ser protector quando a exposição solar é baixa, sugerindo que tanto a dieta como a exposição solar influenciam o risco de EM na população em geral.

Apesar destas evidências, parece ser de extrema importância verificar que estas variações nas concentrações séricas de 25(OH)D se devem apenas a factores ambientais (dieta e exposição solar) ou se existe uma contribuição genética que explique e relacione estas alterações da vitamina D encontradas nos pacientes com EM.

INFECÇÕES VIRAIS

A infecção por vírus Epstein – Barr (EBV) tem sido consistentemente associada à Esclerose Múltipla (Ascherio e Munger, 2007). Vários estudos seroepidemiológicos têm demonstrado que cerca de 100% dos pacientes adultos com EM estão infectados com EBV, contra 95,8% dos controlos saudáveis na mesma faixa etária, pelo que esta condição parece ser um pré-requisito no desenvolvimento de EM. Apesar de se tratar de uma infecção comum na população geral, esta diferença foi também verificada na população pediátrica, com 88% das crianças com EM infectadas por EBV contra cerca de 50% nos controlos saudáveis adaptados à faixa etária o que apoia um envolvimento deste factor ambiental. A presença de anticorpos anti-EBV no LCR foi também comparada, surgindo positiva em pacientes com EM e negativa em pacientes com outras afecções neurológicas (Cepok et al., 2005). Além disso, algumas meta-análises revelaram que pacientes que desenvolveram mononucleose infecciosa têm um maior risco de desenvolver EM, em média 10 anos após a infecção, quando comparados com indivíduos infectados com EBV assintomáticos (Thacker et al., 2006).

Como referido na Tabela 3, esta infecção parece não ter o mesmo impacto no risco de desenvolvimento de EM nas diferentes fases da vida do indivíduo. Apesar de ser possível a transmissão materno-fetal do EBV (Avgil et al., 2006), existem poucas evidências de que infecções virais *in útero* ou neonatais possam aumentar o risco de EM. Os indivíduos que desenvolvem EM na idade adulta apresentam altos níveis de anticorpos anti-EBV no início da idade adulta, sugerindo que no período da adolescência esta infecção aumenta a predisposição para o aparecimento de EM (DeLorenze et al., 2006). Relativamente à mononucleose infecciosa aumenta particularmente o risco de EM, duplicando-o, sobretudo se ocorrer após os 15 anos (Hernan et al., 2001).

Na idade adulta, um indivíduo que seja seronegativo para EBV não tem virtualmente risco de desenvolver EM pois a infecção por este vírus é comum a praticamente 100% dos

pacientes com EM. Esta infecção é muito frequente na população geral, o que torna pouco provável que a infecção por EBV após o início da idade adulta seja um factor que aumente de forma significativa o risco de EM. Em pacientes com EM estabelecida existem evidências de reactivação do EBV apenas durante os surtos e não na EM clinicamente estável (Lindsey et al., 2009). Aliás, níveis aumentados de anticorpos contra EBV latente estão associadas a um risco maior de conversão para uma clínica de EM definitiva após um evento de desmielinização isolado e estão ainda relacionados com o número de lesões na RMN e com quantificação de incapacidade presente (Lünemann et al., 2010).

As infecções do tracto respiratório têm sido associadas ao aparecimento da EM na idade adulta (Kriesel et al., 2005) e a uma maior actividade da doença nos pacientes (Edwards et al., 1998), parecendo actuar como um factor desencadeante de surtos, contudo estas conclusões podem ser confundidas com a variação da exposição solar ao longo do ano, podendo constituir um viés nestes estudos.

O Vírus Herpes Humano 6 (HHV-6) é um vírus linfotrópico neurotrópico com capacidade de infectar vários tipos de células, nomeadamente células da glia do SNC. Alguns autores descreveram a presença de vírus HHV-6 na superfície das placas de desmielinização e um aumento da presença de anticorpos anti-HHV-6 nos indivíduos com EM (Ascherio e Munger, 2007) e outros detectaram DNA viral no LCR destes doentes (Alvarez-Lafuente et al., 2008) o que sugere uma infecção activa mas estas observações não foram comprovadas por outros investigadores. Desta forma, os dados disponíveis parecem apoiar uma associação entre uma replicação intra-tecal ou sistémica do HHV-6 e o aumento do risco para EM ou a uma maior actividade da doença nos pacientes, provavelmente por mecanismos de mimíca molecular. Contudo, a grande seroprevalência deste vírus, superior a 80% a partir dos 2 anos de idade, torna praticamente impossível retirar conclusões sobre a sua influência no risco de EM em indivíduos sero-negativos.

Este ano foi publicado um artigo finlandês, onde foi estudada uma população de 407 doentes com EM da região sudoeste deste país, onde se sugere que quando existe um pico de infecção por EBV e pelo vírus Influenza A na população em geral, ocorre um aumento do número de surtos nos pacientes com EM (Oikonen et al., 2011).

Estes dados apoiam uma etiologia infecciosa na EM, com o EBV no principal papel, mas nunca capaz de desencadear esta doença isoladamente. Com os dados disponíveis até à data, podemos inferir que infecções virais e quiçá bacterianas, poderão de alguma forma modificar, activar ou criar condições anómalas no sistema imunitário, despoletando uma série de reacções auto-ímmunes, provavelmente por fenómenos de mímica molecular, em indivíduos com susceptibilidade genética, que podem conduzir aos episódios de desmielinização agudos que caracterizam esta afecção neurológica.

TABAGISMO

Nos últimos anos, o tabagismo tem sido implicado como um factor ambiental que aumenta o risco de desenvolvimento de EM em alguns estudos (Ascherio e Munger, 2007).

A acção nefasta do tabaco no contexto da EM, ainda não é bem conhecida, contudo, para além da nicotina, também apresenta na sua constituição centenas de componentes potencialmente tóxicos, entre eles o alcatrão, monóxido de carbono e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Os efeitos biológicos do tabaco incluem alterações vasculares, do sistema imunitário, aumento da produção de óxido nítrico, aumento do risco de infecções respiratórias e um potencial efeito directo neurotóxico dos cianetos e outros compostos (Costenbader e Karlson, 2006).

O seu constituinte major, a nicotina, num estudo realizado em ratos, provocou um aumento do fluxo sanguíneo microvascular cerebral, potenciando o influxo de solutos através da barreira hemato-encefálica (BHE) (Chen et al., 1995). Esta consequência do metabolismo da nicotina tem sido sugerida como possível desencadeante de EM, eventualmente por uma perda da eficácia de selectividade da BHE (Zivadinov et al., 2009).

O tabaco afecta a activação de neutrófilos, macrófagos e monócitos levando ainda a um aumento da expressão do marcador de activação Fas (CD95) na superfície dos linfócitos B e T CD4+ (Bijl et al., 2001). Está também associado a um aumento da proteína C reactiva (PCR), interleucina-6 e metabolitos urinários do tromboxano, importantes marcadores de inflamação nas doenças auto-imunes (Bermudez et al., 2002). Além disso, tem efeitos anti-estrogénicos, afectando o sistema hormonal na mulher, criando desequilíbrios na expressão de linfócitos Th1 e Th2 (Cutolo et al., 2004).

Estas importantes alterações no sistema imunológico poderão estar na origem de reacções auto-imunes e como tal, potenciadoras de um processo de auto-desmielinização.

Alguns estudos epidemiológicos têm fornecido dados importantes sobre a influência do tabaco no risco de desenvolver EM e o período da vida em que a sua presença é mais nefasta para aumentar este risco.

Um estudo prospectivo de caso-controlo demonstrou um aumento da susceptibilidade para EM na idade adulta em indivíduos com mães fumadoras durante a gravidez (Montgomery et al., 2008). Este estudo poderá indicar que o tabaco poderá influenciar ainda *in útero* o risco para EM, mas o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está esclarecido.

Vários estudos estabelecem um aumento do risco em indivíduos que tenham fumado em algum período da sua vida, quando comparados com indivíduos que nunca fumaram (Hedström et al., 2009) e ainda que este risco de desenvolver EM é dose-dependente, pelo menos, para a população feminina (Hernan et al., 2001).

O curso clínico de indivíduos com EM também se altera com o tabagismo. O risco de conversão de um síndrome clínico isolado em EM clinicamente definitiva é maior em indivíduos fumadores (Di Pauli et al., 2008). Os indivíduos com EMSR têm um risco aumentado de evoluir para uma EM progressiva secundária se tiverem fumado alguma vez na sua vida, em comparação com aqueles que nunca fumaram (Healy et al., 2009). Para além disso, a carga tabágica individual relaciona-se com o grau de incapacidade neurológica nestes doentes (Pittas et al., 2009). O risco de uma apresentação clínica inicial primária progressiva de EM é significativamente superior nos fumadores do que nos não fumadores (Healy et al., 2009).

ETIOLOGIA GENÉTICA

Os dados epidemiológicos a favor de uma influência genética na susceptibilidade para a EM surgiram em estudos já antigos sobre o contexto familiar desta doença.

No Norte da Europa, o risco de recorrência da EM em parentes de indivíduos afectados é aproximadamente de 2% e a prevalência da doença é aproximadamente 1 caso em 1000 pessoas (Oksenberg et al., 2010). Para além dos parentes, familiares em segundo e terceiro grau do indivíduo com EM têm um risco acrescido de desenvolver a doença. De facto, apesar da maioria dos casos de EM ocorrerem de forma espontânea, cerca de 20% são indivíduos com um familiar afectado (Kahana E. et al., 2000).

Estudos canadianos que envolveram indivíduos adoptados, irmãos partilhando apenas um progenitor ou esposas de indivíduos com EM, confirmam que os factores genéticos são primariamente responsáveis pela correccorrência desta doença nas famílias (Ebers et al., 2000) e poderão influenciar a trajectória e o curso da doença, para além da susceptibilidade até agora discutida.

Num estudo realizado por Rosati et al., 2001, sobre a prevalência mundial da EM, concluiu-se que uma análise crítica dos dados epidemiológicos disponíveis naquela data, conduziam a uma revisão de alguns conceitos anteriores, nomeadamente acerca do papel dos genes na susceptibilidade para a doença. Como exemplo, a raridade da doença entre os Lapões, Turcos, Uzbeks, Kazakhs, Siberianos nativos, índios americanos do Norte e Sul, Chineses, Japoneses, Africanos nativos e Maoris da Nova Zelândia, e o alto risco para a doença nos Sardenhos, Palestinianos e Parsis (Índia), demonstram claramente que a susceptibilidade para a EM varia entre os diversos grupos étnicos e raciais, sendo determinante na distribuição geográfica heterogénea da doença.

Ainda segundo o mesmo autor, quando é feita uma análise mais recente da distribuição da EM na Europa, são reveladas algumas exceções ao gradiente norte - sul anteriormente descrito, sendo necessárias mais explicações do que uma simples relação prevalência - latitude. Por exemplo, o gradiente norte - sul verificado nos Estados Unidos da América, que se interpretou à luz de um componente ambiental (Vitamina D), acaba por coincidir com os padrões de emigração europeia: áreas com frequências mais altas correspondem a populações com antepassados da Escandinávia e as áreas com frequências mais baixas à distribuição das pessoas de origem de raça negra (Ebers et al., 1993), favorecendo a hipótese genética como factor etiológico da doença.

EVIDÊNCIAS PARA A ETIOLOGIA GENÉTICA

ESTUDOS FAMILIARES

Ao longo das últimas décadas, tem ficado bem estabelecido entre a comunidade médica, nomeadamente entre os neurologistas, que o risco para desenvolver EM é maior nos familiares dos indivíduos afectados e que isto se relaciona com a carga genética partilhada entre eles. O padrão de risco de recorrência familiar tem contundentemente sugerido, na maioria dos estudos desenvolvidos, uma panóplia de variantes envolvidas, tornando difícil a identificação de factores de risco individuais ou na arquitectura genética subjacente à susceptibilidade para a EM (IMSGC, 2010).

Muitos estudos de risco familiar têm sido publicados, mas tomemos como exemplo o estudo de coorte desenvolvido na Dinamarca por Nielsen et al., 2005. Neste trabalho, recolheu-se informação de um total de 8205 pacientes com EM entre 1968 e 1997, dos seus familiares em primeiro grau (pais, descendentes e irmãos) e cônjuges. Foram encontrados 90 casos de EM no grupo de familiares em primeiro grau versus 12,6 dos casos que seriam esperados, daí surgindo um risco relativo (RR) de 7,1 (95% IC:5,8-8,8). Após estratificação das análises por grau de parentesco, foram encontrados RR semelhantes para os pais (6,4), descendentes (6,8) e irmãos não-gêmeos (8,6) seguindo um padrão de risco de recorrência familiar característico da EM. Após estratificação analítica foi encontrado um RR inferior para familiares do sexo feminino (5,9) em relação aos do sexo masculino (9,3). Aliás, esta tendência também foi verificada quando se analisaram os números para esta mesma relação mas nos indivíduos afectados pela EM, surgindo um RR de 8,8 para os indivíduos do sexo masculino versus um RR de 6,0 para o sexo feminino, o que contraria a relação encontrada em numerosos estudos de 2:1 mulher/homem. Contudo esta diferença revelou-se não ser estatisticamente significativa. Entre 33 irmãos gêmeos dos pacientes com EM, foram observados 2 casos, contra 0,02 que seriam esperados, resultando num RR de 85,8, de

sublinhar que em ambos os casos se tratava de gémeos monozigóticos, favorecendo a hipótese genética. Ainda em relação aos cônjuges, foram observados 3 casos de esposas dos pacientes com EM, contra 5 casos esperados, revelando um RR de 0,6, o que sugere a ausência de um factor ambiental de relevo na etiologia desta doença. Assim, comparando o risco de EM dos familiares directos com o da população em geral, foram encontrados os seguintes valores: 2,9% vs 0,5% para as mulheres e 2,8% vs 0,3% para os homens.

Neste estudo de coorte, é encontrado um risco aumentado sete vezes, de desenvolver EM, em familiares de pacientes com esta afecção, independentemente do grau de parentesco. Esta interessante observação parece ser argumento para uma etiologia genética ou ambiental, contudo, o considerável alto risco verificado sobretudo entre gémeos monozigóticos torna a hipótese genética mais plausível.

A aparente relação inusitada entre o sexo feminino e masculino, encontrada neste trabalho contraria as tendências observadas noutros estudos. O RR menor observado em familiares do sexo feminino relativamente ao sexo masculino, sobretudo em mulheres em que o paciente afectado era também do sexo feminino, é um facto curioso. A observação de uma diferença entre os RR em relação ao sexo do paciente afectado por EM é, todavia, consistente com o modelo de hereditariedade multifactorial clássico, que prevê um risco aumentado em familiares do paciente, pertencentes a um grupo de baixo risco para a afecção (familiares de pacientes do género masculino têm um risco aumentado comparativamente aos familiares de um paciente do género feminino), devido à grande carga génica entre os pacientes dos grupos de baixo risco (Fraser et al., 1976).

A predominância da EM no sexo feminino encontrada em diversos estudos epidemiológicos, numa relação à volta de 2:1, suscitou várias questões a médicos e investigadores, surgindo a hipótese de uma possível associação ao cromossoma X. Contudo, a

análise detalhada do cromossoma X demonstrou ser pouco provável a existência quer de um locus independente associado a uma maior susceptibilidade quer de um locus que interaja com o HLA. Deste estudo conclui-se que na génese desta patologia poderão estar implicadas interacções complexas, nomeadamente epigenéticas, camufladas por polimorfismos equilibrados (Herrera et al., 2007).

O estudo de coorte dinamarquês acaba por contribuir com novas evidências epidemiológicas a favor de um componente familiar forte na etiologia da EM. Porém, é indispensável não esquecer que estudos de coorte, com intervalos de tempo largos e com visões retrospectivas dos casos clínicos, como é o caso, podem ser vítimas de viés.

Desta forma, o padrão de recorrência familiar não obedece uma transmissão genética tipo mendeliana, do que se pode concluir que estamos provavelmente na presença de uma doença poligénica.

ESTUDOS GENÉTICOS

O estudo genético clássico da Esclerose Múltipla revelou-se desde cedo um grande desafio, devido à escassez de famílias com vários casos de EM, onde se observasse um padrão de transmissão claro e homogêneo (Oksenberg e Baranzini, 2010).

Contudo, os diversos achados epidemiológicos ao longo dos anos, apontam para a existência de um componente hereditário poligênico. O avanço e a evolução das técnicas laboratoriais e do estudo do genoma humano têm permitido um conhecimento cada vez maior da forma como a carga genética interfere na susceptibilidade para a EM.

Recentemente surgiram os Genome Wide Association Study (GWAS), que permitem uma análise de praticamente todo o genoma dos indivíduos de uma amostra populacional a estudar. São testados centenas de milhares de SNPs (single-nucleotide polymorphisms) com o objectivo de encontrar uma associação com uma determinada doença, em centenas de milhares de pessoas. Estes estudos têm revolucionado a pesquisa do peso da genética em patologias de etiologia complexa ou desconhecida como a EM. Nestas condições, e ao contrário de doenças determinadas por uma única alteração genética, a multiplicidade factorial, hereditária ou ambiental, são objectivados de uma forma integrada, mesmo que a contribuição de cada um seja mínima (Manolio, 2010). Os perfis genéticos de um grupo com determinada patologia que se pretende estudar, no caso concreto a EM, é comparado com o de um grupo controlo, identificando SNPs comuns entre os indivíduos com EM e que estejam ausentes no grupo controlo.

Estes estudos vieram ultrapassar alguns dos problemas associados aos estudos genéticos previamente utilizados (amostras pequenas, estudo clínico retrospectivo dos casos e a existência de variáveis independentes, difíceis de controlar e passíveis de causar viés).

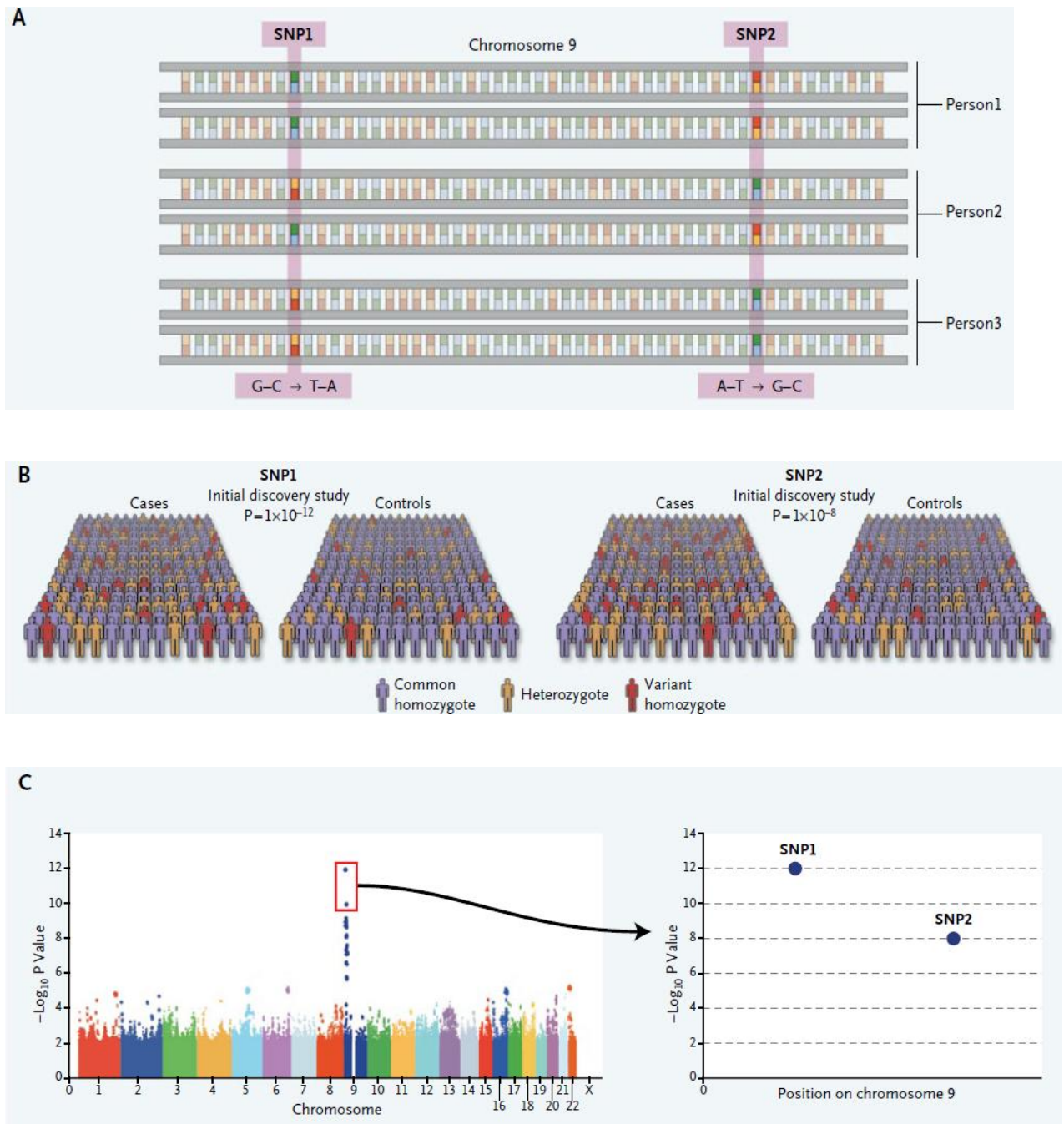


Figura 4. *Genome Wide Association Study* – é tipicamente baseado num estudo caso – controlo em que são identificados vários SNPs no genoma humano. **A** – Identificação de um pequeno *locus* no cromossoma 9. **B** – A força de associação entre cada SNP e a doença a estudar, que é calculada com base na prevalência de cada SNP nos casos e nos controlos. **C** – Os valores de probabilidade de cada SNP que passa o controlo de qualidade, com cada cromossoma numa cor diferente (retirado de Manolio, 2010).

Os últimos GWAS na área da EM identificaram genes comuns associados ao risco de desenvolver a doença e ao fenótipo clínico de apresentação, interferindo não só na susceptibilidade mas também na idade de apresentação e na severidade da própria doença, (Baranzini et al., 2009).

As descobertas científicas nesta área têm atribuído um papel *major* aos genes do HLA (Human Leucocyte Antigen), que se encontram na região MHC (Major Histocompatibility Complex), no cromossoma 6p21 (6p21-p23) mas alguns GWAS também identificaram genes marginais à região MHC associados à EM (Tabela 6).

Os GWAS referidos não só confirmaram os *loci* identificados pelas técnicas clássicas como também forneceram evidências para vários novos *loci* que interferem com o risco para a EM, que não serão explanados na sua totalidade neste trabalho.

Estudo	População de Origem	Número de SNPs	Loci/Genes
<i>Wellcome Trust Case – Control Consortium (2007)</i>	Reino Unido	14,436	IL7R
<i>International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2007)</i>	EUA	334,923	HLA, IL2R, IL7R, CLEC16, CD58, EVI5, TYK2
	Reino Unido		
<i>Comabella et al (2008)</i>	Espanha	500,000	HLA, 13q31.3
	EUA		
<i>Gene Associations in Multiple Sclerosis Consortium (2009)</i>	Holanda	551,642	HLA, GPC5, PARK2, PDZRN4, CSMD1
	Suiça		
<i>Australia and New Zealand Genetics in Multiple Sclerosis Consortium (2009)</i>	Austrália	303,431	HLA, METTL1, CD40
	Nova Zelândia		

<i>De Jager et al (2009)</i>	EUA		
	Reino Unido		
	Holanda	2,557,248	TNFRSF1A, IRF8, CD6, RGS1
	Suiça		
<i>Jakkula et al (2010)</i>	Finlândia	297,343	STAT3
<i>Sanna et al (2010)</i>	Sardenha	6,600,000	HLA, CBLB

Tabela 6. GWAS recentemente publicados na área da EM (adaptado de Oksenberg e Baranzini, 2010).

Cada alelo da região HLA é caracterizado por um conjunto de dígitos separados por 2 pontos (:). Os primeiros dígitos são referentes ao grupo do alelo que geralmente correspondem a um antígeno serológico. O segundo conjunto de dígitos é utilizado para distinguir os alelos que apesar de fazerem parte do mesmo grupo, diferem numa sequência de aminoácidos (Disanto et al., 2010).

A região do HLA foi alvo de um mapeamento detalhado, estendendo-se à classe II, encontrando-se para a população do Norte da Europa os seguintes alelos: HLA-DRB5*01:01-HLA-DRB1*15:01-HLADQA1*01:02-HLA-DQB1*06:02 (Fogdell et al., 1995), sendo dado na actualidade um papel predominante ao alelo HLA-DRB1*15:01. A presença deste alelo aumenta o risco para EM e tem sido encontrado em praticamente todas as populações estudadas. Um estudo de coorte afro-americano confirmou ainda um papel major do HLA-DRB1 (Caillier et al., 2008; Ramagopalan e Ebers, 2009).

Estas variantes genéticas também têm sido associadas aos diferentes fenótipos clínicos da EM. Por exemplo, num estudo canadiano, a frequência do alelo HLA-DRB1 foi comparada entre pacientes com formas leves (EMSR) e formas malignas (EMPP e EMPR). O alelo DRB1*01 demonstrou ser protector para a progressão clínica da doença, nas formas

esporádicas ou familiares da doença. Curiosamente, nos casos de doença familiar, o efeito protector do alelo DRB1*01 só era significativo quando fazia parte do genótipo DRB1*01-DRB1*15:01. Este encontrava-se igualmente distribuído entre as formas leves e malignas de EM, porém, uma grande parte de pacientes homozigóticos para o DRB1*15:01, apresentavam um fenótipo maligno (De Luca et al., 2007). Este papel protector do DRB1*01 foi também confirmado num estudo de coorte australiano, mas uma vez mais, apenas na presença do DRB1*15 no outro alelo (Stankovich et al., 2009). Ainda num estudo francês, foi encontrada uma correlação positiva entre o DRB1*15:01 e a progressão da doença nas formas EMSR mas não nos grupos com EMPP (Cournu-Rebeix et al., 2008).

Apesar destes achados parecerem contraditórios, isto pode dever-se a diferenças no desenho dos estudos. A comparação entre as formas EMPP e EMSR pode ainda ser falaciosa dada a heterogeneidade clínica dentro dos subgrupos da EM.

Os genes do HLA parecem estar envolvidos em doenças imuno-mediadas, devido ao seu papel na apresentação antigénica. Por isso, uma das razões para que diferentes alelos do HLA-DRB1 levem a diferentes resultados entre os pacientes com EM poderá prender-se com as diferentes especificidades antigénicas (Disanto et al., 2010).

Vários alelos do HLA-DRB1 têm sido associados à EM em diversas populações estudadas (Tabela 4).

Alelos do HLA-DRB1	População	Referências
*01	Canadá	Ramagopalan et al., 2007
	Suécia	Dyment et al., 2005
	EUA	Yeo et al., 2007
	Reino Unido	Bergamaschi et al., 2007
*03	Canadá	Ramagopalan et al., 2007
	Suécia	Dyment et al., 2005
	Reino Unido	Masterman et al., 2000
	EUA	Barcellos et al., 2006
	Itália e Sardenha	Marrosu et al., 2001
	Espanha	
*4	Sardenha	Marrosu et al., 2001
*7	Itália	Ballerini et al., 2004
*8	Canadá	
	Reino Unido	
	EUA	Barcellos et al., 2006
	Itália	
	Espanha	
*9	Japão	Matsuoka et al., 2008
*10	Canadá	Ramagopalan et al., 2007
		Dyment et al., 2005
*11	Canadá	Ramagopalan et al., 2007
		Dyment et al., 2005
*13	Sardenha	Marrosu et al., 2001
	Israel	Kwon et al., 1999

*14	Canadá	
	Reino Unido	
	EUA	Ramagopalan et al., 2007
	Itália	Dyment et al., 2005
	Espanha	
*15	Praticamente Universal	

Tabela 4. Associações entre o HLA classe II e a EM conhecidas (adaptado de Disanto et al., 2010).

Os mecanismos exactos pelos quais o DRB1 influencia a susceptibilidade da EM permanecem ainda indeterminados. Contudo, estarão provavelmente relacionados com as funções fisiológicas das moléculas de HLA nos numerosos processos imunológicos, como a apresentação, captação antigénica e a determinação das funções das células T.

Além destes, vários estudos também investigaram a presença de alelos HLA classe I, que actuam independentemente do loci da classe II, verificando que estes diminuem o risco de EM, se o DRB1*15:01 estiver também ele presente (Tabela 5).

Alelos HLA classe I	População	Referências
A*02	Suécia	Bergamaschi et al., 2010
	Itália	Brynedal et al., 2007
B*44	Reino Unido	Rioux et al., 2009
	EUA	
Cw*05	Reino Unido	Yeo et al., 2007
	EUA	

Tabela 5. Associações entre o HLA classe I e a EM conhecidas (adaptado de Disanto et al., 2010).

Como vimos, existem áreas do genoma exteriores à região MHC que também apresentam alguns *loci* associados à EM.

Inumeros genes têm sido encontrados através dos GWAS, nomeadamente o IL7R, IL2RA (CD25), CD58, CLEC16A, EVI5 e GPC5 (Baranzini et al., 2009), confirmando o poder de identificação desta nova abordagem genética.

O IL7R, que codifica a sub-unidade α do receptor da interleucina 7, apresenta-se como um gene verdadeiramente associado à susceptibilidade para a EM, localizado na região marginal ao MHC. Este parece relacionar-se com a diferenciação e sobrevivência dos linfócitos T e B (Gregory et al., 2007).

De interesse especial temos a identificação do Glipican 5 (GPC5). Os glipicanos são uma classe de proteoglicanos heparam sulfato, que se encontram na superfície externa da membrana plasmática, interferindo no controlo da divisão e regulação do crescimento celular, mas também estão envolvidos na formação sináptica e regeneração axonal. A sua presença em placas activas da EM sugere um papel pró-inflamatório (Filmus et al., 2008) e também um papel farmacogenómico associado à terapêutica com Interferão β (Byun et al., 2008).

O efeito da presença do gene IL2RA é curioso, dado o seu envolvimento em patologias como a EM mas também na Diabetes *Mellitus* tipo I (DM tipo I), Doença de Graves e Artrite Reumatóide. De facto, o alelo do IL2RA associado à susceptibilidade para a EM confere resistência para DM tipo I, mas um segundo alelo deste gene confere susceptibilidade para as duas doenças e um terceiro alelo está apenas associado a uma maior susceptibilidade para DM tipo I.

A maioria destes genes está relacionada com o sistema imunitário, o que confirma a hipótese auto-imune desta doença. Porém, a sua abrangente expressão genética pode indicar

diferentes mecanismos envolvidos nas respostas imunes, quer inata quer adquirida, envolvidas na patogénese da doença.

A complexidade desta patologia associada à sua heterogeneidade de alelos do MHC pode sugerir que os diversos componentes da mielina ou a complexidade da estrutura da sua bainha possam ser os alvos da reacção imunitária. As diferenças na especificidade antigénica e o papel da proteína da bainha de mielina podem levar a diferenças nas manifestações clínicas, de uma forma paciente-dependente (Disanto et al., 2010).

A associação destes novos estudos com a identificação genética tem alterado dramaticamente o paradigma de estudo da EM, permitindo o desenvolvimento de um modelo, provavelmente mais preciso das contribuições genéticas na patogénese desta doença (Baranzini et al., 2009). Contudo, o estudo global e abrangente do genoma humano pode conduzir à identificação de genes ou SNPs que não estão directamente relacionados com a etiologia da EM mas sim com a sua patofisiologia, nomeadamente genes envolvidos nos mecanismos de acção inflamatória, criando factores confusionais na interpretação destes estudos.

DOENÇA MULTIFACTORIAL

Os estudos desenvolvidos até ao momento sobre a EM não têm conseguido estabelecer um consenso quanto à sua etiologia, como visto anteriormente. De facto, os factores mencionados parecem influenciar quer a susceptibilidade para a EM, quer o fenótipo clínico desta e até mesmo o curso desta doença. Tem sido difícil compreender se a diversidade de fenótipos reflecte uma verdadeira heterogeneidade etiológica (Lennon et al., 2004), se ocorre uma modificação nas funções específicas de determinados genes (DeLuca et al., 2007) ou se se trata da combinação das duas (Baranzini et al., 2009).

Os estudos de gémeos de diferentes populações revelam que um gémeo monozigótico de um indivíduo com EM tem um risco maior de desenvolver a doença do que um gémeo dizigótico (Willer et al., 2003). Contudo, seria de prever um risco muito maior nos monozigóticos do que o encontrado, cerca de 24% (Hansen et al., 2005), se esta patologia fosse apenas determinada geneticamente. Estas observações epidemiológicas demonstram a complexidade desta doença e da possível interferência do ambiente nesta. Por exemplo, a extensão da concordância para a EM entre gémeos monozigóticos parece estar relacionada com a latitude do local de nascimento (Islam et al., 2007) expondo uma vez mais as interacções multifactoriais delicadas envolvidas na susceptibilidade para a EM. De referir, contudo, que esta concordância incompleta para a EM entre gémeos não deve ser taxativamente atribuída apenas a potenciais agentes ambientais, pois poderá reflectir a ocorrência de rearranjos génicos na linha germinativa (levando à codificação de uma grande variedade de receptores imunológicos alternativos), incorporação de sequências retro-virais, mutações somáticas, alterações epigenómicas.

Assim, a recorrência familiar e a taxa de concordância da EM para gémeos não traduzem a presença de uma doença com hereditariedade mendeliana, mas antes uma doença

com carácter poligénico (Oksenberg e Baranzini, 2010). Assim, a susceptibilidade para a EM é hereditária, mas o risco de a desenvolver poderá estar na dependência de uma variável ambiental.

A favor de um componente multifactorial subjacente à EM temos também as evidências do papel da Vitamina D na expressão génica do HLA. Esta vitamina regula a expressão do HLA-DRB1*15:01 da classe II do MHC, contribuindo para a ideia de uma interacção multifactorial na etiopatogénese da doença EM (Ramagopalan et al., 2009).

Goodin descreveu um modelo verosímil para esta patologia, descrevendo dois períodos da vida onde a exposição aos factores ambientais (exposição solar precoce – Vitamina D – e posterior infecção pelo EBV) são cruciais: a infância e a adolescência (Goodin, 2009). Nestes períodos, os factores ambientais são activos e interagem com os factores genéticos, inerentes a cada indivíduo, conduzindo a um risco geral para a EM. A falta de Vitamina D numa fase precoce da vida poderá influenciar a imunogénese, alterando a resposta do sistema imunitário à infecção pelo EBV, predispondo o indivíduo à EM (Correale et al., 2009).

A verdade é que quer os estudos a favor de uma hipótese genética, quer a favor da hipótese ambiental na etiologia da EM não são conclusivos nem taxativos nas suas conclusões.

Uma das hipóteses etiológicas que tem sido muito debatida nos últimos anos entre a comunidade científica e defendida por alguns, não só em relação à EM, mas a um sem número de patologias com prevalência aumentada nos países desenvolvidos é a *hipótese higiénica* e as suas implicações no que toca à maturação do sistema imunitário humano.

Esta hipótese formulada por Leibowitz et al. (1966) sugeria que a EM poderia estar associada a altos níveis de higienização. Efectivamente, os estudos epidemiológicos

realizados nos países desenvolvidos têm demonstrado um aumento explosivo de doenças auto-imunes e de alergias, onde quase 50% da população apresenta atopia, desenvolvendo condições patológicas como asma ou outras alergias (Holgate et al., 1999). Quanto à auto-imunidade, um exemplo paradigmático é o aumento dramático da incidência e prevalência da Diabetes *Mellitus* insulino-dependente no mundo desenvolvido (Bach et al., 2002), o que parece estar a ocorrer também na EM nos países desenvolvidos. Já nos países em vias de desenvolvimento, as alergias e as doenças auto-imunes são raras. Este padrão epidemiológico dicotómico carece contudo de evidências científicas. Para explicar estas mudanças na distribuição global e temporal das afecções alérgicas e auto-imunes, Yazdanbakhsh et al., 2002 descreveram a hipótese higiénica como “a falta de infecções intensas no mundo industrializado motivada pelas melhores condições higiénicas, vacinação e uso de antibióticos, podem alterar o sistema imunitário humano, levando a respostas inadequadas perante substâncias inócuas, conduzindo a atopia e reacções de autoimunidade”. Contudo, é necessário sublinhar que esta hipótese assenta apenas na ideia de que a ausência de exposições a agentes infecciosos trava uma evolução normal daquilo que é a maturação do sistema imunitário, constituindo um factor crítico para o surgimento de doença em indivíduos que são susceptíveis por questões genéticas ou devido a outras predisposições. Esta teoria tem sido apoiada por inúmeras investigações no campo da epidemiologia, da imunologia básica, em modelos animais e em estudos humanos com agentes probióticos. A importância desta teoria na EM é considerável tendo em conta não só as inúmeras evidências de uma possível infecção na sua etiopatogénese mas também no facto de que moléculas imuno-modeladoras produzidas por agentes infecciosos poderão ter um efeito benéfico e até preventivo de doenças auto-imunes (Fallon e Alcami, 2006). Em modelos animais de EM, com encefalomielite auto-imune experimental, alguns estudos demonstraram que a imunização ou infecção de ratos com *Schistosoma mansoni* reduziu a severidade da doença (La Flamme et al., 2003). No que

toca às diversas descobertas imunológicas no campo da EM, provou-se que existe uma diminuição da actividade das células T reguladoras (Baecher-Allan et al., 2006).

Num estudo longitudinal de pacientes com EM de Correale e Farez, 2007, foram comparados 2 grupos de pacientes, um grupo formado por pacientes com infecção intestinal parasitária e outro grupo não infectado. No primeiro não foi utilizada medicação anti-parasitária. Estes grupos foram acompanhados durante 4,5 anos e comparados em parâmetros clínicos, imagiológicos (RMN) e imunológicos. Quando comparados com o grupo-controlo não infectado, os pacientes com EM com infecção parasitária intestinal apresentavam uma diminuição dramática de episódios de surtos, incapacidade adquirida, lesões novas ou aumentadas na RMN em T2 (ou após administração de gadolínio). Assim, ocorreu uma diminuição da actividade da doença de cerca de 90% nos pacientes com EM e infecção intestinal parasitária, segundo os parâmetros apresentados. Desta forma, este estudo é consistente com a hipótese higiénica mas apesar da excitação que estas descobertas possam causar quanto à compreensão da etiopatogénese desta afecção e nas potenciais terapêuticas daí decorrentes, é necessária precaução na interpretação deste estudo, dado o tamanho da amostra e o desenho observacional do estudo.

Uma vez mais, esta hipótese higiénica reforça a ideia da existência de uma interacção genética e ambiental na EM, provavelmente comum às várias doenças com um componente auto-imune.

A heterogeneidade epidemiológica, clínica, genética e imunológica característica desta patologia faz suspeitar de uma etiologia complexa, onde vários factores interagem entre si precipitando a activação de uma resposta auto-imune.

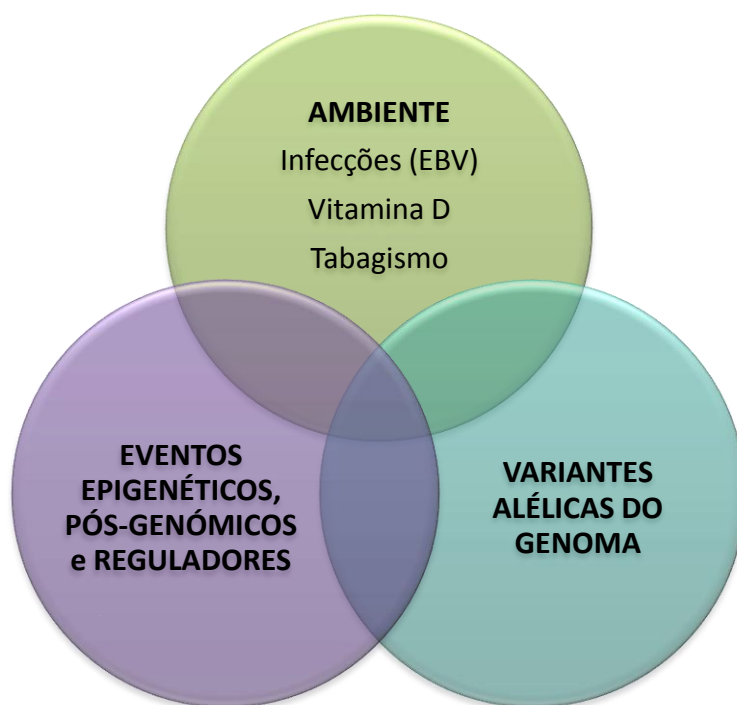


Figura 5. A EM é uma doença complexa, caracterizada por um risco modesto de hereditariedade e com interações multifacetadas entre os factores genéticos e ambientais (adaptado de Oksenberg e Baranzini, 2010).

CONCLUSÕES

A Esclerose Múltipla é uma doença neurológica, altamente complexa e multifacetada, cujos mecanismos subjacentes à sua etiopatogénese não são totalmente conhecidos. De igual forma ainda não foram identificados marcadores biológicos, testes diagnósticos fiáveis ou tratamento efectivo (cura) para esta afecção neurológica.

Vários estudos epidemiológicos demonstram um gradiente Norte – Sul na distribuição das taxas de prevalência da EM no hemisfério norte do globo, aumentando à medida que nos afastamos da linha do Equador. Esta distribuição tem sido relacionada com a diminuição da exposição solar associada a este gradiente. A vitamina D surge assim como um dos factores ambientais associados à EM, verificando-se que nos países nórdicos, por exemplo, os doentes com EM apresentam valores séricos mais baixos de vitamina D do que a população geral.

Os estudos de migração, nomeadamente o das Ilhas Faroé, sugerem um agente transmitido *de novo* à população insular pelas tropas britânicas, provavelmente infeccioso, como o EBV ou HHV-6, despoletando vários clusters de EM nos residentes das ilhas.

A vitamina D tem um importante papel imuno-modelador, pelo que níveis séricos baixos estão relacionados com uma diminuição da capacidade de resposta do sistema imunitário podendo traduzir uma associação entre a baixa exposição solar e uma maior susceptibilidade para infecções. Esta susceptibilidade por imaturidade do sistema imunitário pode conduzir a fenómenos de mimica molecular, um dos mecanismos que parece estar subjacente às reacções de auto-imunidade.

Atendendo a que os factores ambientais referidos são modificáveis e os estudos apontam para contribuições efectivas destes no risco de EM, coloca-se a questão do conceito da prevenção da EM. A evicção dos factores ambientais nas idades críticas em que estes actuam será suficiente para prevenir o desenvolvimento de EM?

Vários estudos epidemiológicos confirmam uma contribuição genética importante para a susceptibilidade da EM. O advento dos GWAS revolucionou o estudo genético das populações, permitindo uma abordagem muito mais abrangente e detalhada do genoma, de amostras populacionais muito numerosas, identificando vários *loci* associados à EM, com uma alta resolução. A sua associação a estudos epidemiológicos e a estudos funcionais torna-se imperativa para comprovar uma verdadeira causa-efeito no que respeita à fisiopatologia desta doença (Fugger et al., 2009) e abre portas à vanguarda de novas estratégias terapêuticas para a EM. A identificação do gene IL2R (CD25), por exemplo, permitiu o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-CD25, o Daclizumab, que estimula a produção e amplifica a função das células NK (natural killer) CD56, estando já em testes de fase II para o tratamento da EM, sendo actualmente utilizado na prevenção da rejeição de órgãos transplantados, nomeadamente transplantes renais (Barten et al., 2010).

Contudo, estes estudos têm identificado sobretudo *loci* envolvidos nos mecanismos de resposta inflamatória, comuns a várias doenças auto-imunes, como é o caso do IL2RA, também associado à Diabetes *Mellitus* tipo I, escasseando evidências de uma pura etiologia genética da EM.

A complexidade da EM e o seu componente auto-imune tornam ainda difícil perceber de que forma as interacções genéticas e ambientais contribuem para a sua génese. A área emergente da Epigenética parece ser fundamental para clarificar estes mecanismos. Estudos recentes sugerem que as reacções auto-imunes se devem a modificações pós-tradução das histonas e metilação do ADN (ácido desoxirribonucleico), mecanismos importantes que poderão estar subjacentes às alterações da tolerância do sistema imunitário e à perpetuação das doenças auto-imunes (Meda et al., 2011).

Os estudos epidemiológicos são essenciais na compreensão do comportamento da EM ao longo dos anos, evidenciando factores e mecanismos subjacentes à sua etiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, De Las Heras V, Domínguez-Mozo MI, Bartolome M, et al. (2008) Herpes viruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 14:595 – 601
2. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, et al. (2001) Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*, 286:3083 – 3088
3. Ascherio A, Munger KL. (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis, part II: noninfectious factors. *Ann Neurol*, 61:504 – 513
4. Auer DP, Schumann EM, Kumpfel T, Gossel C, Trenkwalder C (2000) Seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 47:276 – 277
5. Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, et al. (2008) Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nature Genetics*, vol. 40, no. 12:1402 – 1403
6. Avgil M, Ornoy A (2006) Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy: consequences of neonatal or intrauterine infection. *Reprod. Toxicol.* 21:436 – 445
7. Bach JF (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347:911 – 931
8. Baecher-Allan C, Hafler DA (2006) Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev*, 212:203 – 216
9. Ballerini C, Guerini FR, Rombolà G, Rosati E, Massacesi L, Ferrante P, Caputo D, Talamanca LF, Naldi P, Liguori M, Alizadeh M, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso

- S (2004) HLA-multiple sclerosis association in Continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 150, no. 1-2:178 – 185
10. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, Radue EW, Lindberg RL, Uitdehaag BM, Johnson MR, Angelakopoulou A, Hall L, Richardson JC, Prinjha RK, Gass A, Geurts JJ, Kragt J, Sombekke M, Vrenken H, Qualley P, Lincoln RR, Gomez R, Caillier SJ, George MF, Mousavi H, Guerrero R, Okuda DT, Cree BA, Green AJ, Waubant E, Goodin DS, Pelletier D, Matthews PM, Hauser SL, Kappos L, Polman CH, Oksenberg JR (2009) Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis, *Hum Mol Genet.* 18(4):767 - 78
11. Baranzini SE, Galwey NW, Wang J, Khankhanian P, Lindberg R, Pelletier D, Wu W, Bernard MJ, Uitdehaag, Kappos L, Polman CH, Matthews PM, Hauser SL, Gibson RA, Oksenberg JR, Barnes MR (2009) Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 18:2078 – 2090
12. Barten LJ, Allington DR, Procacci KA, Rivey MP (2010) New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther.* 24;4:343 – 66
13. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BC, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR (2006) Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 18:2813 – 2824
14. Bergamaschi L, Leone MA, Fasano ME, Guerini FR, Ferrante D, Bolognesi E, Barizzone N, Corrado L, Naldi P, Agliardi C, Dametto E, Salvetti M, Visconti A,

- Galimberti D, Scarpini E, Vercellino M, Bergamaschi R, Monaco F, Caputo D, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S (2010) HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes and Immunity*, vol. 11, no. 2:173 – 180
15. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM (2002) Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22:1668 – 1673
16. Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG (2001) Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Eur J Clin Invest*, 31:550 – 553
17. Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, Hillert (2007) HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2:e664
18. Burks JS, Johnson KP (2000). *Multiple Sclerosis: Diagnosis, Medical Management, and Rehabilitation*. Demos: NY
19. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernández O, Brassat D, Comabella M, Wang J, Barcellos LF, Baranzini SE, Oksenberg JR (2008) Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*.65(3): 337- 44
20. Caillier SJ, Briggs F, Cree BA, Baranzini SE, Fernandez-Viña M, Ramsay PP, Khan O, Royal W 3rd, Hauser SL, Barcellos LF, Oksenberg JR (2008) Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 8:5473 – 5480

21. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 115:1352 – 1360
22. Chao MJ, Ramagopalan SV, Herrera BM, Lincoln MR, Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC (2009) Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex. *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 2:261 – 266
23. Chen JL, Wei L, Berezcki D, Hans FJ, Otsuka T, Acuff V, Ghersi-Egea JF, Patlak C, Fenstermacher JD (1995) Nicotine raises the influx of permeable solutes across the rat blood-brain barrier with little or no capillary recruitment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15:687 – 698
24. Confavreux C. (2006) Multiple sclerosis: the new frontier *Rev Prat*. 56(12): 1290-2
25. Correale J, Farez M (2007) Parasite infections modulate the immune response in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61:97 – 108
26. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI (2009) Immunomodulatory effects of vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 132:1146 – 1160
27. Costenbader KH, Karlson EW (2006) Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus*, 15:737 – 745
28. Cournu-Rebeix I, Génin E, Leray E, Babron MC, Cohen J, Gout C, Alizadeh M, Perdry H, Semana G, Brassat D, Clerget-Darpoux F, Yaouanq J, Edan G, Rosenheim M, Fontaine B (2008) HLA-DRB1* allele influences the later course of relapsing remitting multiple sclerosis. *Genes and Immunity*, vol. 9, no. 6:570 – 574
29. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH (2004) Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13:635 – 638

30. Dean G, (1971) Multiple sclerosis in migrants to South Africa. *Isr J Med Sci.* 7(12): 1568
31. De Sá J, Paulos A, Mendes H, Becho J, Marques V, Roxo J (2006) The prevalence of multiple sclerosis in the District of Santarém, Portugal. *J Neurol*, 253:914 – 918
32. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A (2006) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch. Neurol.* 63:839 – 844
33. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymment DA, Lincoln MR, Montpetit A, Pugliatti M, Barnardo MC, Risch NJ, Sadovnick AD, Chao M, Sotgiu S, Hudson TJ, Ebers GC (2007) An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 52:20896 – 20901
34. Di Pauli F, Reindl M, Ehling R, Schautzer F, Gneiss C, Lutterotti A, O'Reilly E, Munger K, Deisenhammer F, Ascherio A, Berger T (2008) Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 14:1026 – 1030
35. Disanto G, Berlanga AJ, Handel AE, Para AE, Burrell AM, Fries A, Handunnetthi L, De Luca GC, Morahan JM (2010) Heterogeneity in multiple sclerosis: scratching the surface of a complex disease. *Autoimmune Dis.* 2011:932351
36. Dymment DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, Risch N, Ebers GC (2005) Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Human Molecular Genetics*, vol. 14, no. 14:2019 – 2026

37. Ebers GC (1993) Multiple sclerosis: new insights from old tools. *Mayo Clin Proc.* 68(7): 711-2
38. Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD (1998) Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64:736 – 741
39. Fallon PG, Alcami A (2006) Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends Immunol* 27:470 – 476
40. Fassbender K, Schmidt R, Mössner R, Kischka U, Kühnen J, Schwartz A, Hennerici M (1998) Mood disorders and dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis: association with cerebral inflammation. *Arch. Neurol.* 55:66 – 72
41. Filmus J, Capurro M, Rast J (2008) Glypicans. *Genome Biol.*, 9, 224
42. Fogdell A, Hillert J, Sachs C, Olerup O (1995) The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5*allele. *Tissue Antigens*, vol. 46, no. 4:333 – 336
43. Fraser FC (1976) The multifactorial/threshold concept—uses and misuses. *Teratology* 14:267 – 280
44. Fugger L, Friese MA, Bell J (2009) From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 9:408 – 417
45. Goodin DS (2009) The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One* 4:e4565
46. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2007) Interleukin 7

- receptor α (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 39:1083 – 1091
47. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO (2005) Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult. Scler.* 11:504 – 510
48. Hauser SL, Oksenberg JR (2006) The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52:61 – 76
49. Hawkes CH (2002) Is multiple sclerosis a sexually transmitted infection? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:439 – 443
50. Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF (1997) Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216:21 – 27
51. Healy BC, Ali EN, Guttman CR, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Moodie J, Berger AM, Duan Y, Bakshi R, Khoury S, Weiner H, Ascherio A (2009) Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 66:858 – 864
52. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L (2009) Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*, 73:696 – 701
53. Hernan MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H (2005) Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain*, 128:1461 – 1465
54. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A (2001) Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 154:69 – 74
55. Hernan MA, Zhang SM, Lipworth L, Olek MJ, Ascherio A (2001) Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 12:301 – 306

56. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur. J. Neurol.* 13:700 – 722
57. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV (2010) Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 6(3): 156-66
58. Hawkes CH, Macgregor AJ (2009) Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult.Scler.* 15, 661 – 667
59. Herrera BM, Cader MZ, Dyment DA, Bell JT, Deluca GC, Willer CJ, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao M, Orton SM, Sadovnick AD, Ebers GC (2007) Multiple sclerosis susceptibility and the X chromosome. *13(7):* 856 – 864
60. Hince M, Sakkal S, Vlahos K, Dudakov J, Boyd R, Chidgey A (2008) The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cell. Immunol.* 252:122 – 138
61. Holgate ST (1999) The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(suppl 1):B2 – B4
62. Hollis BW (1996) Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcif Tissue Int,* 58:4 – 5
63. Hoppenbrouwers IA, Liu F, Aulchenko YS, Ebers GC, Oostra BA, van Duijn CM, Hintzen RQ (2008) Maternal transmission of multiple sclerosis in a Dutch population. *Arch. Neurol.* 65:345 – 348
64. Hunter D, De Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, Spector TD. (2001) Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J Bone Miner Res,* 16:371 – 378
65. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Mack TM (2007) Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins, *Neurology.*24;69(4): 381-8

66. Juntunen J, Taskinen E, Luisto M, Livanainen M, Nurminen M (1982) Cerebrospinal fluid cells and proteins in patients occupationally exposed to organic solvents. *J. Neurol. Sci.* 54:413
67. Kahana E (2000) Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. *Biomed Pharmacother*, 54 (2): 100 – 102
68. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI (2007) Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*, 254:471 – 477
69. Kira J (2008) Neuromyelitis optica and Asian phenotype of multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1142:58–71
70. Kriesel JD, Sibley WA (2005) The case for rhinoviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 11:1 – 4
71. Kurtzke JF (2000) Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol Sci.* 21(6): 383-403
72. Kwon OJ, Karni A, Israel S, Brautbar C, Amar A, Meiner Z, Abramsky O, Karussis D (1999) HLA class II susceptibility to multiple sclerosis among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews. *Archives of Neurology*, vol. 56, no. 5:555 – 560
73. La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT (2003) Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun* 71:4996 – 5004
74. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L (2002) A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 3:940 – 943

75. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M (1966) Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple Sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29:60 – 68
76. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A (2005) Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis *JAMA* 293:2496 – 2500
77. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton SM, Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC (2009) Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 18:7542 – 7547
78. Lindsey JW, Hatfield LM, Crawford MP, Patel S (2009) Quantitative PCR for Epstein-Barr virus DNA and RNA in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 15:153 – 158
79. Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, Caballero E, Münz C, Montalban X, Comabella M (2010) Elevated EBNA1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* Doi 10.1002:21886
80. Manolio TA (2010) Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med* 363:166 – 176
81. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, Cocco E, Mancosu C, Schirru L, Solla E, Fadda E, Melis C, Porru I, Rolesu M, Cucca F (2001) Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Human Molecular Genetics*, vol. 10, no. 25:2907 – 2916

82. Masterman T, Ligers MA, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J (2000) HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, vol. 48, no. 2:211 – 219
83. Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Kawano Y, Minohara M, Mihara F, Nishimura Y, Ohyagi Y, Kira J (2008) Association of the HLA-DRB1 alleles with characteristic MRI features of Asian multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, vol. 14, no. 9:1181 – 1190
84. McGrath JJ, Feron FP, Burne TH, Mackay-Sim A, Eyles DW (2004) Vitamin D3a implications for brain development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 89-90 (1-5): 557-60
85. Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C, (2011) The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol*.
86. Miller DH, Hammond SR, McLeod JG, Purdie G, Skegg DC (1990) Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: are the determinants genetic or environmental? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 53(10): 903-5
87. Montgomery SM, Bahmanyar S, Hillert J, Ekbom A, Olsson T (2008) Maternal smoking during pregnancy and multiple sclerosis amongst offspring. *Eur. J. Neurol.*, 15:1395 –1399
88. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 296:2832 – 2838
89. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, Henriksen NK, Melbye M (2005) Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol* 162(8): 774 – 778
90. Oikonen M, Laaksonen M, Aalto V, et al. (2011) Temporal relationship between environmental Influenza A and Epstein-Barr viral infections and high multiple sclerosis relapse occurrence. *Mult Scler*. 2011 Jan 6:

91. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL (2004) Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *American Journal of Human Genetics*, vol. 74, no. 1:160 – 167
92. Oksenberg JR, Baranzini SE (2010) Multiple sclerosis genetics - Is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol*. 6(8): 429-37
93. Orton SM, Wald L, Confavreux C, Vukusic S, Krohn JP, Ramagopalan SV, Herrera BM, Sadovnick AD, Ebers GC (2011) Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology*, 76, 5:425 – 431
94. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J (2006) Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Genet*. 14:15959
95. Pittas F, Ponsonby AL, van der Mei IA, Taylor BV, Blizzard L, Groom P, Ukoumunne OC, Dwyer T (2009) Smoking is associated with progressive disease course and increased progression in clinical disability in a prospective cohort of people with multiple sclerosis. *J. Neurol*. 256:577 – 585
96. Pittock SJ, McClelland RL, Mayr WT, Jorgensen NW, Weinshenker BG, Noseworthy J, Rodriguez M (2004) Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Annals of Neurology*, vol. 56, no. 2:303 – 306
97. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymont DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2007) The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PloS Genetics*, vol. 3, no. 9:1607 – 1613
98. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymont DA, Deluca GC, Herrera BM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Knight JC (2009)

Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet.* 5:e1000369

99. Ramagopalan SV, Ebers GC (2009) Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome Medicine*, vol. 1, no. 11:105
100. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G (2010) Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*, vol. 9, no. 7:727 – 739
101. Rigby WF, Waugh M, Graziano RF (1990) Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25- dihydroxyvitamin D3. *Blood* 76: 189–197
102. Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarström L, Fernando MM, Green T, De Jager PL, Foisy S, Wang J, de Bakker PI, Leslie S, McVean G, Padyukov L, Alfredsson L, Annese V, Hafler DA, Pan-Hammarström Q, Matell R, Sawcer SJ, Compston AD, Cree BA, Mirel DB, Daly MJ, Behrens TW, Klareskog L, Gregersen PK, Oksenberg JR, Hauser SL. (2009) Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immunemediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 44:18680 – 18685
103. Rosati G, (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 22(2): 117-39
104. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC (2000) Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet* 58:431 – 435
105. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, Ebers GC (2010) The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*, vol. 133, no. 7:1914 – 1929

106. Serafini B, et al. (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* 204:2899 – 2912
107. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA (1999) Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 9:69 – 92
108. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R (2008) Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol*, 194:7 – 17
109. Souberbielle BE, Szawlowski PW, Russell WC (1995) Is there a case for a virus aetiology in multiple sclerosis? *Scott. Med. J.* 40:55 – 62
110. Stankovich J, Butzkueven H, Marriott M, Chapman C, Tubridy N, Tait BD, Varney MD, Taylor BV, Foote SJ, Kilpatrick TJ, Rubio JP (2009) HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis. *Tissue Antigens*, vol. 74, no. 1:17 – 21
111. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*, 59:499 – 503
112. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) Bush WS, Sawcer SJ, de Jager PL, Oksenberg JR, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, (2010) Evidence for Polygenic Susceptibility to Multiple Sclerosis - The Shape of Things to Come. *The American Journal of Human Genetics*, vol. 86:621 – 625
113. Tremlett H, van der Mei IA, Pittas F, Blizzard L, Paley G, Mesaros D, Woodbaker R, Nunez M, Dwyer T, Taylor BV, Ponsonby AL (2008) Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 31(4): 271-9
114. Van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV, Butzkueven H, Kilpatrick T (2003) Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* 327(7410):316

115. Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C (2007) Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78(7): 707-9.
116. Whitacre CC (2001) Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol*. 2:777 – 780
117. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100:12877 – 12882
118. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC (2005) Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ*, 330:120
119. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002, 296:490 – 494
120. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, Fenoglio C, Ban M, Taylor CJ, Goodman RS, Walsh E, Wolfish CS, Horton R, Traherne J, Beck S, Trowsdale J, Caillier SJ, Ivinson AJ, Green T, Pobywajlo S, Lander ES, Pericak-Vance MA, Haines JL, Daly MJ, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Hafler DA, Rioux JD, Sawcer S (2007) A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, vol. 61, no. 3:228 – 236