

## RESUMO

A Esclerose Múltipla é uma doença crónica, inflamatória, auto-imune e desmielinizante do Sistema Nervoso Central. Apesar da etiologia ser desconhecida, há evidência geográfica, biológica e imunológica de que um baixo fornecimento ambiental de Vitamina D está associado a um aumento do risco de desenvolvimento de Esclerose Múltipla. Estamos perante um patologia em que parecem existir interacções complexas entre susceptibilidade genética e factores ambientais.

O papel da Vitamina D na homeostase do cálcio é bem conhecido. No entanto, a Vitamina D tem-se tornado um tema de interesse pela sua relação com a Esclerose Múltipla. A principal razão para tal deve-se à distribuição geográfica da doença. Áreas com elevada exposição solar, o principal indutor da síntese desta vitamina, têm baixa prevalência de Esclerose Múltipla e vice-versa. Para além disso, baixos níveis séricos do principal metabolito da Vitamina D (25-hidroxitamina D3) estão associados a uma maior incidência da doença. Apesar da maioria do aporte de Vitamina D poder ser garantido por uma adequada exposição solar, é dada também importância ao papel da alimentação. Em países como a Noruega, em que a prevalência da doença não aumenta com a latitude, níveis adequados de vitamina D seriam mantidos através de uma dieta rica nesta vitamina e em Ácidos Gordos polinsaturados contendo elevados níveis de Ómega-3.

Para além da vertente epidemiológica, diversos estudos têm clarificado a interacção da Vitamina D com o sistema imunitário e com a componente genética. A nível imunitário, existem evidências de que a Vitamina D é capaz de favorecer um desvio da imunidade no sentido anti-inflamatório (Th1 → Th2) bem como de ter um papel activo no impedimento da libertação de Linfócitos T reactivos contra auto-antígenos. Neste último processo, parece haver uma relação directa com a componente genética, nomeadamente com a presença de haplotipos dos Antígenos Leucocitários Humanos, em particular com a presença do haplotipo

HLA-DRB1\*1501. Este está associado a um maior risco do desenvolvimento da doença sendo a sua expressão influenciada pela presença de Vitamina D.

Neste trabalho pretendo efectuar uma revisão da literatura para melhor compreender a relação entre a Vitamina D e a Esclerose Múltipla e o possível valor da suplementação oral com Vitamina D nesta patologia.

Conclui-se que, apesar de todos os avanços, o papel exacto da função da Vitamina D no surgimento e desenvolvimento da Esclerose Múltipla é ainda desconhecido. No entanto torna-se cada vez mais evidente a sua implicação na doença. Muitos clínicos acreditam que a suplementação oral com doses elevadas de vitamina D em doentes com Esclerose Múltipla possa vir a ter um efeito benéfico, havendo já alguma evidência nesse sentido que carece, no entanto, de estudos controlados. Já no caso da suplementação com vista a prevenção da doença, será ainda precoce a sua implementação, no entanto, tem-se vindo a propor a investigação dessa possibilidade.

## **ABSTRACT**

Multiple Sclerosis is a chronic, inflammatory, autoimmune and demyelinating disease of the central nervous system. Although the aetiology remain obscure, there are geographical, biological, and immunological evidence that exposure to low environmental supplies of Vitamin D is associated with an increased risk of developing Multiple Sclerosis. We are confronting a disease where complex interactions between genetic susceptibility and environmental factors seem to exist.

The Vitamin D role in calcium homeostasis is well-known. However, the relation between Multiple Sclerosis and Vitamin D has become a topic of interest. The main reason for this is the observed geographical disease distribution. Areas with high sunlight exposure, the principal inducer of vitamin D synthesis, have a relatively low prevalence of Multiple Sclerosis and vice versa. Furthermore, low levels of the principal Vitamin D metabolite (25-hydroxy Vitamin D) in the blood circulation are associated with a high incidence of Multiple Sclerosis. Although most part of Vitamin D requirements can be provided by sun exposure, diet contribution has been noticed as significant. In Countries, like Norway, in which Multiple Sclerosis prevalence does not increase with latitude, Vitamin D sufficiency would be maintained through a diet providing Vitamin D as well as marine omega-3 polyunsaturated fatty acids.

Besides the epidemiological role, several studies have cleared the Vitamin D interaction with immune and genetic components. In what immune system is concerned, evidence supports a model in which Vitamin D mediates a shift to a more anti-inflammatory profile (Th1 → Th2). Furthermore, there seems that Vitamin D has an active role in blocking auto-reactive T cells release. In this last process, it seems to be a direct relationship with genetic component, namely with Major Histocompatibility Complex haplotypes, and in particular with HLA-DRB1\*1501 haplotype. The presence of this haplotype is associated

with an increase risk of developing Multiple Sclerosis and its expression is influenced by Vitamin D.

In this study, I intend to do a review in order to fully understand the relation between Vitamin D and Multiple Sclerosis and the value of Vitamin D supplementation in this disease.

We conclude that, besides all developments, the exact role of Vitamin D function in Multiple Sclerosis arises and development is still unknown. However, it is more and more obvious its involvement in the disease. Lots of physicians believe that Vitamin D supplementation in Multiple Sclerosis patients would be beneficial. There has already been evidence pointing that direction but controlled studies are required. In what concerns Vitamin D supplementation to prevent the disease, it could be too early to implement that. However, investigation in that area has been proposed.

**PALAVRAS CHAVE:** Vitamina D, Esclerose Múltipla, Suplementação, HLA-DRB1\*1501, Vírus Epstein-Barr, Radiação UV-B.

## **DEFINIÇÃO E ASPECTOS CLÍNICOS**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crónica, inflamatória, desmielinizante e degenerativa do Sistema Nervoso Central (SNC). Tem sido atribuída a um processo autoimune dirigido contra componentes da mielina central ou das suas células precursoras, os oligodendrócitos. Afecta mais frequentemente o adulto jovem entre os 15 e os 45 anos de idade, sendo mais atingido o sexo feminino, numa proporção aproximada de 2:1. A raça branca é a mais afectada, seguindo-se a raça negra e por fim a amarela numa proporção de 1:0,67:0,22 (Wallin et al., 2004).

A EM pode-se apresentar sob a forma de episódios agudos de agravamento neurológico, deterioração neurológica gradual progressiva ou uma combinação das duas. Às diferentes formas clínicas têm sido atribuídas as designações de: Surto-Remissão, Secundária Progressiva, Primária Progressiva, e Progressiva com Surtos.

Descrito por Schumacher em 1965, um surto é um episódio de deterioração neurológica com duração mínima de 24 horas não associado a febre ou infecção. Considera-se que dois episódios são considerados como 2 surtos quando ocorrem com o intervalo mínimo de 30 dias (McDonald et al., 2001).

A forma clássica e mais frequente da doença, presente na fase inicial em 85% dos casos (Raine et al., 2008), é designada de Surto-Remissão. Caracteriza-se pela existência de surtos que são seguidos de recuperação variável. Do ponto de vista clínico, mas não patológico, há períodos de estabilização (Remissão) que têm duração variável, de meses a anos.

A forma Secundária Progressiva afecta cerca de 30% do total dos doentes, corte transversal, (Raine et al., 2008) e resulta da evolução da forma anterior. Estima-se que ao fim de 10 anos, 50 % dos doentes com a forma Surto-Remissão desenvolvam esta forma da doença. Ao fim de 25 a 30 anos de doença, a percentagem será de 90%. Nesta forma a deterioração é progressiva e poderá ocorrer ou não com surtos.

A forma Primária Progressiva está presente em cerca de 10 a 15% dos casos. Caracteriza-se por uma progressão da incapacidade desde o início podendo, no entanto, ocorrer algumas flutuações. Nestes doentes, mais frequentemente do sexo masculino, a doença manifesta-se geralmente mais tarde, após 40 anos, havendo geralmente um maior atingimento medular.

A forma menos frequente (5%) é designada a Progressiva com Surtos (“Relapsing-Progressive”). Há um agravamento progressivo desde o início, com o aparecimento de surtos, geralmente num período mais tardio.

Apesar do grande avanço dos exames complementares de diagnóstico, a clínica continua a ter um papel preponderante no diagnóstico da doença. A Ressonância Magnética, o estudo do Líquido Cefaloraquídeo (LCR) e os Potenciais Evocados são importantes na corroboração do diagnóstico e na exclusão de “outras causas” capazes de produzir uma clínica semelhante. A localização da lesão no SNC vai determinar os sinais e sintomas da doença. Do ponto de vista patológico, na área de lesão, pode existir inflamação, edema, desmielinização, perda axonal e gliose. A sintomatologia é diversa e frequentemente dependente do envolvimento das vias ópticas, sensitivas, motoras, autonómicas (disfunção urinária e sexual) e neuro-comportamentais (Raine et al., 2008). Os sinais e ou sintomas iniciais mais frequentes da doença são: fraqueza em um ou mais membros (40%), nevrite óptica (22%), parestesias (21%), diplopia (12%), vertigem (5%) e alteração da micção (5%) (Compston et al., 2006). Ao longo do curso da doença múltiplos outros sintomas podem surgir (Tabela I anexa).

<b>Sintoma / sinal</b>	<b>%</b>	<b>Sintoma / sinal</b>	<b>%</b>
Perda sensorial	90	Depressão	25-54
Fraqueza do membro inferior	90	Hipoestesia	25
Espasticidade	90	Fraqueza do membro superior	22
Nistagmo	85	Diminuição da lubrificação vaginal	21
Nível sensitivo (sensibilidade proprioceptiva dos membros inferiores)	85	Alterações retinianas perivenosas	20
Aumento da frequência urinária	80	Falta de equilíbrio	20
Urgência urinária	80	Distúrbios sensoriais paroxísticos	20
Nictúria	80	Dor difusa	20
Fadiga	80	Distúrbios motores paroxísticos	15
Perda fibra nervosa retiniana	80	Doença bipolar	13-40
Atrofia óptica	77	Euforia	10-60
Alterações cognitivas	70	Nevralgia do trigémio	10-30
Obstipação	70	Hipoestesia do trigémio	10
Neurite óptica	65	Nível sensorial (dor e temperatura)	10
Disfunção erétil	63	Tremor de ação	10
Urgência miccional e retenção	60	Paralisia do nervo abducente (VI)	10
Ataxia da marcha e tronco	50-80	Disfagia	10
Incontinência	50	Dor radicular	10
Espasmos	50	Hemiplegia	9
Cãibras	50	Diminuição acuidade auditiva	5-17
Disartria	50	Vertigem	5-50
Tremor de intenção	50	Síndrome da mão desajeitada	5
Atrofia muscular	50	Convulsões	5
Diminuição da libido	40	Nistagmo posicional primário	5
Dor	40	Paralisia facial	4-16
Disfunção da ejaculação	37	Disartria paroxística	≤4
Cefaleia	30	Hipotermia	Raro

Nível sensitivo (sensibilidade proprioceptiva dos membros superiores)	30	Neuropatia periférica	Raro
Nível sensitivo (sensibilidade termo-álgica dos membros inferiores)	30	Paralisia nervo óculo-motor (III)	Raro
Sinal de Lhermitte	30	Paralisia nervo troclear (IV)	Raro
Oftalmoplegia internuclear	30	Síndrome de Parinaud	Raro

**Tab. I – Sinais e sintomas que podem ocorrer na EM**

Adaptado de: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 13.

A correlação entre a clínica e o processo patológico na EM está longe de ser perfeita, mas a compreensão da patologia e fisiopatologia da doença ajuda a explicar muitas das suas características clínicas e é um suporte indispensável para o desenvolvimento de terapêuticas destinadas ao controlo da doença.

**ETIOLOGIA**

A etiologia da EM não é conhecida. Acredita-se que se trata de uma doença autoimune induzida por vírus. No entanto, a possibilidade de se tratar de um processo infeccioso primário com uma reacção imune associada não está excluída apesar de não ter sido conseguida a identificação do agente causal. Ao longo das últimas quatro décadas tem sido relatada a presença de altos títulos de anticorpos no soro e no LCR contra variados vírus, incluindo o vírus do sarampo, herpes, varicela, rubéola, influenza C e algumas estirpes de parainfluenza. Apesar de nunca ter sido possível demonstrar a relação clara entre algum destes agentes infecciosos e o patogénese da doença existem várias evidências desta possibilidade. Foi demonstrado a presença de partículas de herpes vírus, particularmente 1,2 e 6, numa proporção significativa de placas de EM (Challoner et al., 1995; Sanders et al., 1996; Weiner et al., 1994), o Acyclovir reduziu o número de surtos (Lyck et al., 1996), e alguns



casos a infecção por *Chlamydia pneumoniae* foi considerada um desencadeante da doença (Yao et al., 1998). Por outro lado, o aparecimento de nevrite óptica, num doente com EM, dois meses após um transplante alogénico de medula óssea devido a uma leucemia mielóide crónica fez questionar a hipótese puramente autoimune da doença (Jeffery et al., 1998).

Nos últimos anos, tem sido amplamente aceite que factores genéticos terão uma parte contributiva importante para o aparecimento de EM. Há evidência que familiares de primeiro grau de doentes com EM têm 20 a 40 vezes maior probabilidade de adquirir a doença (Ebers et al., 1986), e que a incidência familiar da doença é de 18% (Ebers and Sadovnick, 1994). No entanto, o facto da concordância entre gémeos monozigóticos ser apenas de 30% (Ebers et al., 1986) sugere que os factores ambientais também possam contribuir para o processo patológico.

Apesar de tudo, nenhum factor só por si foi identificado como causal. Isto pode significar que a contribuição de cada factor de risco seja pequena ou que os diferentes factores exerçam efeitos adicionais ou permissivos. Segundo Holmoy T. (Holmoy T., 2007), a Vitamina D (Vit. D) e o Vírus Epstein-Barr (EBV) estão no topo da lista dos potenciais factores ambientais associados à EM. Baseado na capacidade do EBV em activar as células T autorreactivas e nos efeitos imunorreguladores da forma activa da Vit. D, Holmov sugere que a Vit. D protegeria o individuo contra a EM através da modulação da resposta imune contra o EBV. Sugere ainda que baixos níveis de Vit. D facilitariam determinadamente a activação das células T auto-reactivas e orientariam a resposta imune contra o EBV no sentido “pró-inflamatório”.

Apesar destas evidências, há ainda muito para descobrir em relação à EM. O que se pode dizer é que estamos perante uma doença causada por uma complexa interacção entre factores genéticos e ambientais e que muitos desafios surgirão no caminho da clarificação dos vários aspectos da mesma.

## **EPIDEMIOLOGIA**

A distribuição geográfica da EM e das suas variantes tem sido sistematicamente investigada ao longo dos últimos 70 anos. É uma doença relativamente comum na Europa, nos Estados Unidos da América, Canadá, Nova Zelândia e partes da Austrália.

A sua incidência é muito baixa na infância, aumenta rapidamente após os 18 anos, atinge um pico entre 25 e 35 anos (ligeiramente mais cedo na mulher do que no homem) e depois desce gradualmente, tornando-se mais rara a partir dos 50 anos (Koch-henriksen et al., 1988; Koch-henriksen, 1999; Mayr et al., 2003;). O sexo feminino é mais atingido, sendo a razão feminino:masculino variável entre 1:1 e 3:4, dependendo dos países em causa (Pugliatti et al., 2006).

A EM tem uma distribuição geográfica típica. A sua prevalência é baixa nas regiões equatoriais e vai aumentando com o aumento da latitude em ambos os hemisférios, sendo maior em regiões como o norte da Europa e dos EUA na ordem dos 130/100000 (Multiple Sclerosis International Federation, 2007). No caso de Portugal, está descrita uma prevalência de 47/100000 (De Sá., 1998).

A prevalência da EM varia não só com a latitude mas também com a altitude (Kurtzke, 1967). Há uma menor incidência da doença a altitudes elevadas o que corresponde a uma maior exposição à radiação solar.

Vários trabalhos têm estudado a influência das migrações na incidência da doença. Num doente que migre de uma zona de alta prevalência para uma zona de baixa prevalência, ele transporta o risco da zona de origem se o fizer depois dos 15 anos. Se a migração ocorrer antes dos 15 anos passa a ter o risco da zona que o acolheu (Hammond et al., 2000; Pugliatti et al., 2002; Van der Mei et al., 2003 ).

Tendo em conta aquelas observações e o facto da radiação ultravioleta do tipo B (UV-B) ser essencial para a activação dérmica da Vit. D, surgiu a hipótese da Vit.D ter um papel importante na curiosa distribuição da prevalência da EM.

## **FISIOLOGIA DA VIT. D**

No Homem, a Vit. D é obtida por duas vias distintas: síntese na pele e alimentação. A síntese na pele é efectuada através da radiação UV-B que cataliza a formação de colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>) a partir de 7-dihidrocolesterol (pré-vitamina D<sub>3</sub>). A Vitamina D<sub>3</sub> é igualmente absorvida por via oral. A partir destas duas fontes, a Vitamina D<sub>3</sub> é metabolizada no fígado para 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) pela enzima 25-hidroxilase. A 25(OH)D<sub>3</sub> é a forma de circulação predominante da Vit. D e a que é a forma doseável. No entanto, a 25(OH)D<sub>3</sub> é biologicamente inactiva e requer a hidroxilação a nível renal (medida pela enzima 1- $\alpha$  hidroxilase) para a forma biologicamente activa (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou calcitriol).

Sabe-se actualmente que muitos outros tecidos (incluindo o cérebro, timo e células do sistema imune) também possuem a enzima 1- $\alpha$  hidroxilase, pelo que não é só a nível renal que há a capacidade de síntese do calcitriol. (Holick 2003; Feldman et al., 2005). O calcitriol tem várias funções, sendo mais conhecido o seu papel na homeostase do cálcio. Os níveis plasmáticos de cálcio são regulados pela hormona paratiróide (PTH) e pelo calcitriol. Um aumento plasmático dos níveis de calcitriol e de PTH levam a um aumento dos níveis plasmáticos de cálcio. O inverso é igualmente válido.

No caso de haver quantidades excessivas de metabolitos da Vit. D, estes são catalizados pela 24- $\alpha$  hidroxilase e excretados pelos rins na forma de ácido calcitroico, o que explica o facto de não haver, em condições normais, hipervitaminose D (Smolders et al., 2008).

Embora ainda haja alguma controvérsia quanto ao nível plasmático normal e óptimo de 25(OH)D3 para manter uma homeostase óssea normal, é defendido que a deficiência de Vit. D corresponde a níveis inferiores a 30 ng/ml (Holick, 2007). No entanto, para as outras funções biológicas da Vit. D considera-se desejável valores muito superiores a 30 ng/mL (Vieth, 2007).

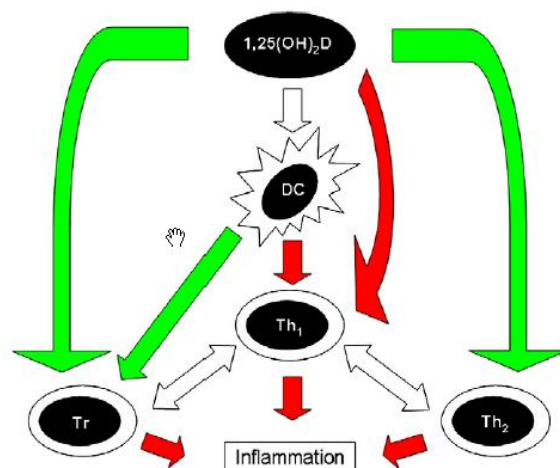
## **VITAMINA D E O SISTEMA IMUNITÁRIO**

A Vit. D interage com o sistema imunitário desempenhando um papel relevante na regulação e diferenciação de células do sistema imune, de forma directa ou indirecta. Desde há algum tempo que é conhecido a associação da Vit. D a doenças auto-imunes. A título de exemplo, foram demonstradas associações entre a baixa exposição solar e um aumento relativo de prevalência de EM e da Doença Inflamatória Intestinal (Ponsonby et al. 2002; Cantorna et al. 2004). A deficiência de Vit. D é também associado a outras doenças autoimunes, incluindo Diabetes Mellitus tipo 1, Lúpus Eritematoso Sistémico e Artrite Reumatóide (Holick, 2004; Kamen, 2006; Arnson Y et al, 2007).

No caso da EM, os surtos estão associados a um aumento da produção de citocinas inflamatórias, incluindo a interleucina (IL) -2, Factor de Necrose Tumoral (TNF)  $-\alpha$ , e Interferão (IFN) -  $\gamma$ , e a diminuição da produção de algumas citocinas anti-inflamatórias como IL-13 e Factor de Crescimento Tumoral (TGF)- $\beta$ 1 (Mahnon BD et al., 2003).

O papel da Vit.D no sistema imune é bastante complexo e seria, por si só, matéria para realização de uma pesquisa aprofundada, pelo que, apenas se faz referência sumária à sua acção. Assim, a 1,25(OH)2D3 é capaz de favorecer um desvio da imunidade no sentido anti-inflamatório (Th1  $\rightarrow$  Th2) (Fig. I; Smolders J et al., 2008). Esta forma activa da Vit. D reduz a produção de citocinas inflamatórias, nomeadamente a IL-2, TNF-  $\alpha$  e IFN-  $\gamma$ . No sentido inverso, a 1,25(OH)2D3 leva ao aumento dos níveis de TGF- $\beta$ 1 (citocina anti-inflamatória),

como foi verificado num estudo com pacientes com EM após 6 meses de suplementação de Vit. D (Mahnon BD et al., 2003).



**Fig. I – Efeitos in vitro da 1,25(OH)2D na sistema imunitário.**

As setas indicam os efeitos directos ou indirectos da 1,25(OH)2D. Setas verdes: influência positiva; Setas vermelhas: influência negativa; Setas brancas: Interação. A influência negativa na inflamação implica um enfraquecimento da resposta inflamatória. DC: células dendríticas; Th1: linfócitos T helper tipo 1; Th2: linfócitos T helper tipo 2; Tr: linfócitos T reguladores.

Em: Smolders J et al., 2008

## **NÍVEIS DE VITAMINA D E EM**

Na população branca Americana níveis baixos de 25(OH)D3 na adolescência estão associados com uma alta incidência de EM, calculando-se uma diminuição de 41 % de incidência por cada aumento de 50 nmol/L nos níveis plasmáticos de 25(OH)D3 (Munger et al., 2006). São curiosos os estudos efectuados em populações da Noruega, Tasmânia e numa população de gémeos norte-americanos que demonstraram que o aumento de actividades na rua durante a infância e adolescência, hipoteticamente relacionadas com o aumento dos níveis plasmáticos de 25(OH)D3, esteja associado a uma diminuição do risco de desenvolvimento de EM (Van der Mei et al., 2003; Islam et al., 2007; Kampman et al., 2007). Ainda nesta óptica, baixos níveis de 25(OH)D3 foram evidenciados durante surtos em pacientes com EM (Soilu-

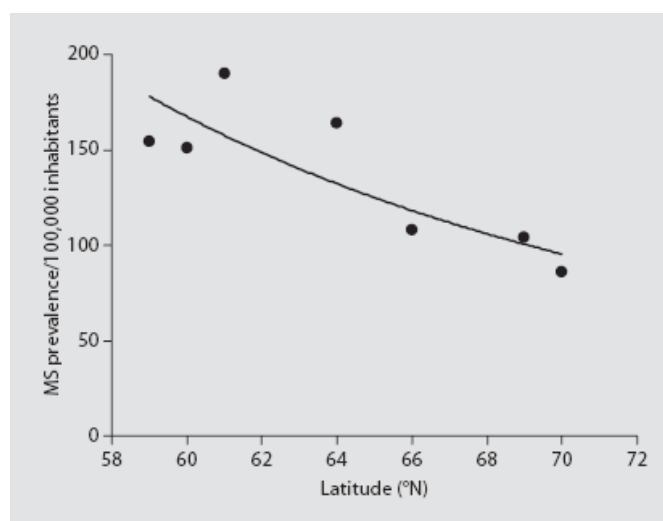
Hanninem et al., 2007). Todos estes factos reforçam a ideia de que os níveis plasmáticos de Vit. D estão relacionados com um aumento de risco de desenvolvimento da EM bem como com a sua evolução.

Por outro lado, há uma questão que se pode colocar: Será a deficiência de Vit. D uma causa ou o resultado da autoimunidade e/ou das terapias com corticosteróides usadas nas fases activas da doença? Numa tentativa de resposta a esta pergunta, um estudo efectuado em 2005, no qual foi dado a 15 doentes um suplemento de 2,5 ug/dia de calcitriol, mostrou que a taxa de exacerbações foi menor que o grupo controlo (Wingerchuck et al., 2005), resultado a favor da primeira hipótese.

Para alguns autores, para além dos níveis plasmáticos desta vitamina, é também dada importância relevante ao papel da alimentação.

### **IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO (Caso da Noruega)**

Tal como foi dito anteriormente, a prevalência da EM aumenta com o aumento da latitude. No entanto, na Noruega, tal não se verifica (Fig. II; Kampman et al.; 2008). A tradição de uma dieta rica em peixe nos locais com menor exposição solar UV-B pode ser a explicação.



**Fig. II – Prevalência da EM versus latitude na Noruega**

Em: Kampman MT et al.; 2008

Os seres humanos dependem, em grande parte, da exposição à radiação UV-B para satisfazer as suas necessidades de Vit. D, mas a Vit.D ingerida pode ser o substituto daquela que é gerada na pele. A 70° N, a luz solar é insuficiente para a síntese de Vit. D na pele durante 5 meses. Surpreendentemente, num estudo realizado em 11 países Europeus, a deficiência sub-clínica de Vit. D no Inverno era mais comum no sul da Europa do que na Escandinávia (Zitterman A.; 2003). No norte da Noruega, a quantidade de Vit. D ingerida através da dieta iguala a quantidade diária recomendada para indivíduos adultos saudáveis. Aqui, as principais fontes de Vit. D ingerida são salmão e a truta (30%), suplementos de óleo de fígado de bacalhau (23%), e margarina ou manteiga suplementadas (23%) (Brustad et al., 2004). O consumo de peixe nesta região é, aproximadamente o dobro do consumo na Europa Central (Welch et al., 2002). Num estudo a 69° N, uma elevada ingestão de Vit. D proveniente da dieta, especialmente no Inverno demonstrou compensar largamente o efeito da variação sazonal da exposição UV-B, prevenindo desta forma a deficiência da vitamina (Brustad et al., 2007).

Noutro estudo efectuado também na Noruega a norte do Círculo Polar Ártico utilizando-se um inquérito alimentar retrospectivo concluiu-se que o consumo de peixe três ou mais vezes por semana durante a infância e adolescência estava associado a um menor risco de EM (Kampman et al., 2007).

Assim, a tradição de uma dieta rica em peixe num local com baixa exposição solar UV-B pode explicar a inexistência de um aumento da incidência da EM com a latitude, reforçando o papel da alimentação.

### **EFEITO DA VIT. D NO MODELO ANIMAL**

Em experiência animal, a evidência de que a Vit. D possa ser um inibidor natural da EM vem de investigações efectuadas em ratos portadores de Encefalite Experimental

Autoimune (EAE) que serve como modelo para a EM. Quando a Vit. D foi dada antes da indução da EAE, a doença foi prevenida. A Vit. D teve também efeitos terapêuticos em ratos com EAE e reverteu os seus sinais de doença (Mark et al., 2006).

Há no entanto que salientar que a EAE não é um excelente modelo de EM e que não podemos transpor completamente os resultados de experiências neste modelo para o Homem. Contudo, experiências como esta são um bom suporte e incentivo à realização de mais investigações na relação Vit. D e EM.

### **INTERESSE DA SUPLEMENTAÇÃO**

Embora os efeitos da 1,25(OH)2D3 observados no modelo animal façam sugerir a importância da sua suplementação, a questão que permanece é se a Vitamina D3 ou os seus análogos terão um potencial terapêutico em seres humanos. Este facto é reforçado por vários de estudos que têm mostrado que suplementos de 1,25(OH)2D3 podem ter esse potencial.

Recentemente, num estudo caso-controlo Norueguês foi encontrado um efeito protector do consumo regular de peixe e óleo de fígado de bacalhau, nomeadamente menores taxas de mortalidade e morbidade (Kampman et al., 2007). Em 39 doentes com EM, uma suplementação de 25 ug Vit. D durante 6 meses levou a um aumento plasmático dos níveis desta vitamina e um aumento significativo da citocina TGF -  $\beta$ 1; no entanto, a correlação com parâmetros clínicos não foi investigada (Mahon et al., 2003). Um pequeno estudo com 12 pacientes a fazer suplementação até 1000 ug/dia de Vit. D durante 28 semanas mostrou uma diminuição do número de lesões realçadas pelo gadolínio na ressonância magnética (Kimball et al., 2007). Num outro estudo com mais de 187 000 mulheres, o uso de suplementos de Vit. D, na forma de multi-vitamínico, mostrou uma redução de 40 % no risco de EM quando comparado com aquelas que não usaram o tal suplemento (Munger et al., 2004). Mais recentemente, no encontro anual da Academia Americana de Neurologia (Abril



de 2009) foram apresentados mais resultados do uso de altas doses de Vit. D em doentes com EM. O estudo em causa consistiu na comparação dos efeitos da suplementação diária desta vitamina em 1000 IU versus 14000IU durante um ano. Foi concluído que, durante o ano do tratamento, a percentagem de doentes que sofreram surtos foi maior no grupo dos que receberam a dose menor de Vit. D (40% contra 16%). Embora resultados como estes sugiram algum benefício da suplementação de Vit. D, mais estudos com um maior número de doentes serão necessários.

Segundo recomendações do Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, os níveis de ingestão adequados de Vit. D para manter a saúde do osso e o normal metabolismo do cálcio em pessoas saudáveis estão entre 5 µg e 15 µg por dia (Tab. II). No entanto, com as novas evidências que ligam a Vit.D a processos patológicos como a autoimunidade e neoplasias considera-se que estes valores poderão estar desactualizados. Em consequência disso, está neste momento a decorrer um estudo no Canadá e EUA que tem como objectivo rever estes valores, tendo em conta as funções e implicações entretanto descobertas para a Vit.D.

Para além da luz solar e como já foi exposto, uma fonte importante de Vit. D é representada pelos produtos alimentares. A tabela III resume as principais fontes desta vitamina. Contudo, as fontes alimentares de Vit.D apresentam grande variabilidade nos teores da mesma, pelo que a ingestão parece ser irregular e insuficiente. Tendo isso em conta e também as evidências que sugerem benefícios, vários autores propõe uma suplementação oral diária.

A dose diária estimada de Vit. D para manter os níveis de 1,25(OH)2D3 acima de 30 ng/ml é de 1 000 IU/dia (25ug/dia) (Heaney et al., 2003). Contudo, e tendo conta que a dosagem dos suplementos de Vit. D usados nos diversos estudos foram escolhidas

arbitrariamente, até à data não existem dados suficientes que nos permitam afirmar a dose exacta da suplementação diária que os doentes deverão efectuar.

<b>Adequate Intake (AI) for Vitamin D</b>			
<b>Life Stage</b>	<b>Age</b>	<b>Males mcg/day (IU/day)</b>	<b>Females mcg/day (IU/day)</b>
Infants	0-12 months	5 mcg (200 IU)	5 mcg (200 IU)
Children	1-13 years	5 mcg (200 IU)	5 mcg (200 IU)
Adolescents	14-18 years	5 mcg (200 IU)	5 mcg (200 IU)
Adults	19-50 years	5 mcg (200 IU)	5 mcg (200 IU)
Adults	51-70 years	10 mcg (400 IU)	10 mcg (400 IU)
Adults	>70 years	15 mcg (600 IU)	15 mcg (600 IU)
Pregnancy	all ages	—	5 mcg (200 IU)
Breast-feeding	all ages	—	5 mcg (200 IU)

Abbreviations: mcg = microgram, IU = international unit

**Tab. II – Níveis adequados de ingestão de Vit.D**

Adaptado de: Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press, 1997

Em: <http://lpi.oregonstate.edu/ss08/vitamind.html>

Nota: 1 µg = 40 IU = 1000ng

1ng/ml = 2.5mmol/L

<b>Fonte</b>	<b>Unidades Internacionais (IU) D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub></b>
Óleo de fígado de bacalhau (uma colher)	1360
Cogumelos shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> ) (secos, 100g)	1600
Cogumelos shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> ) (fresco, 100g)	100
Atum, sardinha, salmão cozinhados (90-100g)	200-360
Produtos lácteos e cereais fortificados (250mL e 30g)	40-100
Gema de ovo (uma)	20
Exposição solar corporal a UV-B (15-20 min ao meio-dia no Verão, indivíduo de pele clara)	10.000

### **Tab. III – Principais Fontes de Vitamina D**

Adaptado de: National Institutes of Health em Fevereiro de 2008

Em: <http://dietary-supplements.info.nih.gov/factsheets/vitamind.asp>

### **SEGURANÇA DA VIT. D EM ADULTOS**

O risco teórico da suplementação com 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seria a hipercalcémia. Esta é considerada assintomática com concentrações de cálcio séricas inferiores a 2,8 mmol /l. Concentrações mais elevadas podem provocar desorientação, fraqueza muscular e arritmias cardíacas. No entanto, a suplementação oral com 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tem-se demonstrado segura. Numa investigação em que se efectuou a suplementação com doses até 1000 ug/dia em 12 pacientes com EM durante 28 semanas, esta conduziu a uma concentração sérica média de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de 386 nmol/L sem causar hipercalcémia ou hipercalcúria (Kimball et al., 2007). O risco de hipercalcémia severa apenas surge quando elevadas quantidades de Vit. D (superiores a 1000 ug/dia ou superiores a 40 000 IU/dia) são consumidas (Schwarz et al., 2005).

## COMPONENTE GENÉTICA

A EM faz parte de um grupo de patologias caracterizadas por um risco hereditário modesto e por uma interação genes-ambiente complexa. O componente genético na EM é sugerido pela agregação familiar de casos e pela alta incidência nalgumas populações étnicas (particularmente as originárias do norte da Europa) quando comparada com outras (grupos africanos e asiáticos) independentemente da sua localização geográfica. Elevadas taxas de incidência da doença são encontradas na Escandinávia, Islândia, Grã-Bretanha, e América do Norte (1-2/1000). Frequências mais baixas são encontradas nos países da Europa do Sul. A doença é rara em certas etnias, como os Samis, Uzbeks, Quirguistaneses, Sibérios, Américo-Índios, Chineses, Japoneses, Africanos Negros e Maoris (Nova Zelândia) (Rosati., 2001).

Vemos assim, que surgem mais exceções (para além do caso da Noruega anteriormente citado) ao modelo de aumento da incidência da doença com o aumento da latitude. Para além disso, o facto de existirem grupos étnicos com menor susceptibilidade à doença em regiões de alto risco, como, por exemplo os ciganos na Bulgária (Milanov et al., 1999) ou os Japoneses nos EUA (Detels et al., 1977), leva-nos a concluir que a explicação para esta distribuição é mais complexa do que a simples relação com a exposição solar, nomeadamente que há factores genéticos determinantes da doença.

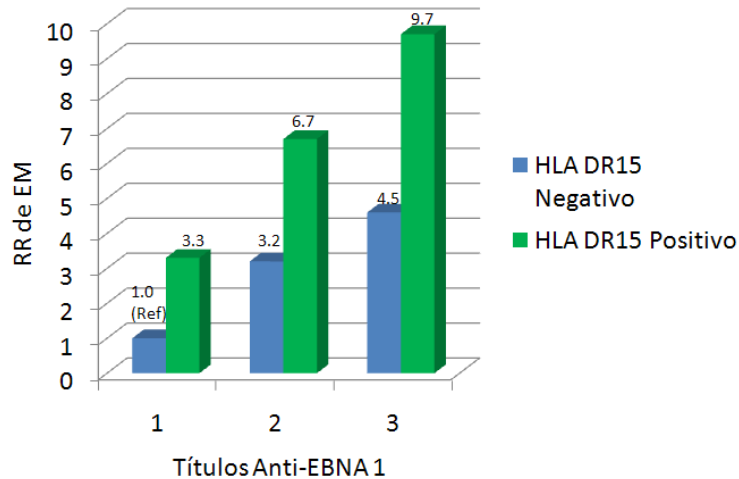
A Genética da EM tem sido uma área de intensa investigação. A associação genética mais forte na população do norte da Europa é a que se relaciona com os haplotipos dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) ou Complexo de Histocompatibilidade Major (MHC), especialmente o que contém HLA-DRB1\*1501, localizado no braço curto do cromossoma 6 (Ramagopalan et al., 2008). Verificou-se que os indivíduos que contêm HLA-DRB1\*1501 têm maior risco de desenvolver a doença (Fogdell et al., 1995). Para além disso, foi descoberto que a Vit. D interage especificamente com HLA-DRB1\*1501, influenciando a sua expressão, na medida em existe uma zona funcional na região promotora proximal do

HLA-DRB1 “Vitamin D response element” (VDRE)” (Ramagopalan et al., 2009). Para haver a transcrição do gene, é necessário que a Vit. D se ligue ao seu receptor (VDR) que por sua vez está ligado ao VDRE existente naquela região. Sendo assim, Ramagopalan et al., propõe a hipótese de níveis séricos baixos de Vit. D levarem a uma menor expressão do HLA-DRB1\*1501 com a consequente diminuição da concentração de auto-antígenos a serem apresentados pelo HLA aos Linfócitos T no seu processo de selecção no Timo, evitando a sua eliminação selectiva. Esta baixa concentração levará assim, a uma baixa afinidade dos receptores dos Linfócitos T (TCR) específicos para o(s) antígeno(s) apresentado(s), o que levará à não delecção dos Linfócitos T específicos para esse(s) antígeno(s). Não ocorrendo essa delecção, há a libertação de Linfócitos T reactivos contra antígenos do próprio individuo, tornando assim o individuo mais susceptível a doença auto-imune.

O facto de a Vit.D influenciar a expressão do HLA-DRB1 de acordo com a hipótese atrás apresentada, é um bom suporte (envolvendo também factores genéticos) à já forte evidência epidemiológica que implica a luz solar e a Vit. D na determinação do risco de EM.

Um outro factor associado a um maior risco de desenvolvimento da EM é a infecção pelo EBV. De acordo com os resultados de múltiplos estudos, o risco de desenvolvimento de EM em adultos, aparentemente saudáveis, aumenta com o aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) contra o antígeno nuclear 1 do EBV (EBNA-1) (Ascherio et al., 2001; Sundstrom et al., 2004; Levin et al., 2005; Delorenze et al., 2006). Reforçando este facto, foi publicado em 2008 um estudo que conclui que a presença de elevados títulos de EBNA-1 associado à presença de do haplotipo HLA-DRB1\*1501 representa um risco de desenvolvimento de EM 9 vezes maior quando comparado com o risco que existe em indivíduos sem nenhum dos dois factores (De Jager et al., 2008; Fig. III). Este autor sugere que a associação destes dois factores tem um efeito potenciador que é superior à soma do risco de cada um isoladamente. Está implícito então que há uma relação biológica entre HLA-

DR15 e a infecção pelo EBV, contudo os contornos da mesma não são totalmente conhecidos. No entanto, este estudo traz mais um suporte para a teoria da existência de uma complexa interação entre factores genéticos e ambientais na etiologia da doença.



**Fig. III – Risco relativo de EM de acordo com títulos de Anti-EBNA 1 e positividade HLA DR15.**

Adaptado de: De Jager et al., 2008.

RR=risco relativo; EM=esclerose múltipla; Anti-EBNA 1= antígeno anti-nuclear do vírus Epstein-Barr; HLA= antígeno leucocitário humano;

Para além do HLA, outros componentes genéticos foram recentemente associados a uma maior susceptibilidade para EM. São eles: o receptor da interleucina 7 (IL7RA), receptor da interleucina 2 (IL2RA) e os genes do membro 1B da família da Cinesina (KIF1B) (Lundmark et al., 2007; Hafler et al., 2007; Aulchenko et al., 2008). O maior destes, KIF1B, tem uma influência relativamente pequena (odds ratio (OR) = 1,3). O HLA (OR = 5,4) poderá ser a “chave” na susceptibilidade à EM. Outros genes susceptíveis identificados parecem ter apenas uma pequena contribuição no risco global (Ramagopalan et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Pretendeu-se efectuar uma compilação do que existe actualmente na literatura acerca da relação Vit.D / EM. Começou-se por explicar a razão pela qual surgiu a hipótese desta vitamina estar ligada à doença, que resultou da análise da distribuição mundial da EM e do facto da radiação UV-B ser essencial para a activação dérmica da Vit.D. Para além disso, efectuou-se uma revisão da acção da Vit. D no sistema imunitário, nomeadamente o seu papel no desvio da imunidade de um perfil pró-inflamatório para um perfil com tendência anti-inflamatória. Em termos de predisposição para a EM, apresenta-se a hipótese integrativa da associação de baixos níveis de Vit.D com a presença do haplotipo HLA-DRB1\*1501 e de níveis séricos elevados de IgG contra EBNA-1 com um maior risco de desenvolvimento da doença. Por outro lado há uma interacção entre estes três factores, nomeadamente o papel activo da Vit.D na expressão do HLA-DRB1\*1501 e a potenciação do risco para a doença quando um mesmo indivíduo possui em simultâneo este haplotipo e anticorpos IgG contra EBNA-1.

Apesar de não se saber o mecanismo de acção exacto da Vit.D no surgimento e desenvolvimento da EM, parece evidente que a Vit.D exerce um importante papel modulador da agressão imune implicada na patologia. Apesar de estarmos ainda numa fase precoce da compreensão de todos os mecanismos, há evidência que suporta um possível papel positivo da suplementação oral de Vit.D na prevenção ou mesmo como adjuvante na terapêutica da doença.

No caso da prevenção, especula-se que esta poderia vir a ser efectuada a grupos de risco (indivíduos com familiares directos com a doença, residentes em áreas com baixa exposição solar, indivíduos com haplotipo HLA-DRB1\*1501 e altos títulos IgG EBNA) essencialmente durante a adolescência e início da idade adulta. Para confirmar esta teoria são necessários grandes estudos longitudinais populacionais que evidenciem uma relação de

causalidade, clarifiquem a relação dose -resposta, e identifiquem factores genéticos e não genéticos que possam modificar a susceptibilidade à doença. Parece prudente aguardar pela investigação que comprove a possibilidade do aumento dos níveis de Vit. D em adolescentes e adultos jovens poder reduzir o risco de EM.

Em relação à utilização da Vit. D como tratamento adjuvante em doentes a situação talvez seja diferente. Como foi explanado existe evidência de que os níveis circulantes de Vit. D, associados a um efeito protector e benéfico para a doença, podem ser obtidos com suplementos orais das mesmas que são considerados seguros. Para além disso, a suplementação oral tem vindo a demonstrar um potencial benefício que é superior ao risco de hipercalcémia. No entanto é desejável para uma boa prática da Medicina Baseada na Evidência a sua demonstração com ensaios clínicos randomizados controlados, duplamente cegos, contra placebo.

Finalizando, é importante salientar que estamos perante uma doença causada por uma complexa interacção de factores genéticos e ambientais e que, inevitavelmente, muitas mudanças surgirão no caminho do seu tratamento e até mesmo prevenção.



## REFERÊNCIAS

- Arnson Y.,** Amital H., Shoenfeld Y., (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *BMJ*; **66**: 1137-42.
- Ascherio A.,** Munger K.L., Lennette F.T., et al., (2001) Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*; **286**: 3083-3088. In: **De Jager P.L.,** Simon K.C., Munger K.L., Rioux J.D., Hafler D.A., Ascherio A., (2008) Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein – Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology*. **70**: 1113-1118.
- Aulchenko Y.S.,** Hoppenbrouwers I.A., Ebers G.C., Ramagoplan S.V., Broer L., Jafari N., et al., (2008) Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet*. In: Romagopalan S.V., Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis- associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics*. **5(2)**: e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.
- Brustad M.,** Alsaker E., Engelsen O., Aksnes L., Lund E., (2004) Vitamin D status of middle-aged women at 65-71 degrees N in relation to dietary intake and exposure to ultraviolet radiation. *Public health Nutr*. **7**: 327-335.
- Brustad M.,** Edvarsen K., Wilsgaard T., et al., (2007) Seasonality of UV-radiation and vitamin D status at 69 degrees north. *Photochem Photobiol Sci*. **6**: 903-908.
- Cantorna M.T.,** Mahon B.D., (2004) Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp. Biol. Med*. **229**: 1136-42.
- Challoner P.B.,** Smith K.T., Parker J.D., et al. (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA*. **92**: 7440-7444. In: Herndon R.M.(eds.). *Multiple sclerosis: diagnosis, medical management and rehabilitation*. New York Demos, 2000: 35-36.
- Compston A.,** McDonald I., Noseworthy J., Lassmann H., Miller D., et al., *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Elsevier, 2006: 572.
- De Jager P.L.,** Simon K.C., Munger K.L., Rioux J.D., Hafler D.A., Ascherio A., (2008) Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein – Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology*. **70**: 1113-1118.
- DeLorenze G.N.,** Munger K.L., Lennette E.T., et al., (2006) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. **63**: 839-844. In: **De Jager P.L.,** Simon K.C., Munger K.L., Rioux J.D., Hafler D.A., Ascherio A., (2008) Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein – Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology*. **70**: 1113-1118.
- Detels R.,** Visscher B.R., Malmgren R.M., et al., (1977) Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in Japanese-Americans. *Am. J. epidemiol*. **105**: 303-310. In: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 214.
- De Sá J.,** Mendes H., Pallos A. et al., (1998) The prevalence of multiple sclerosis in Portugal: results of a population-based study. *Multiple Sclerosis*. **4**: 368.
- Ebers G.C.,** Bulman D.E., Sadovnick A.D., Paty D.W., Warren S., Hader W., Murray T.J., Seland T.P., Duquette P., Grey T., et al., (1986) A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N. England J. Med*. **315**: 1638-1642.
- Ebers G.C.,** Sadovnick A.D., (1994) Association studies in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. **53**: 117-122.
- Feldman D.,** Glorieux F.H., Pike J.W., (2005) Vitamin D. San Diego; London: Academic press.
- Fogdell A.,** Hilbert J., Sachs C., Olerup O., (1995) The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5\*0101 allele. *Tissue Antigens*. **46**: 333-336. In: Romagopalan S.V, Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis- associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics*. **5(2)**: e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.
- Hafler D.A.,** Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., et al., (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* **357**: 851-862. in: Romagopalan S.V, Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis- associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics*. **5(2)**: e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.
- Hammond S.R.,** English D.R., Mcleod J.G. (2000). The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from migrant population in Australia. *Brain*; **123**: 968-974.
- Haren M,** Shoenfeld Y. (2006) Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? *Ann NY Acad Sci*; **1069**: 322-45.
- Heaney R.P.,** Davies K.M., Chen T.C., Holick M.F., Barger-Lux M.J., (2003) Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am. J. Clin. Nutr*. **77**: 204-210.
- Holick M.F.** (2003) Vitamin D: a millennium perspective. *J. Cell Biochem*. **88**: 296-307.
- Holick M.F.** (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; **80**: 1678-88S.
- Holick M.F.,** (2007) Vitamin D deficiency. *N. England J. Med*. **357**: 266-281.

- Holmoy T.**, (2007) Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: Synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis. *Medical Hypotheses* **70**: 66-69.
- Islam T.**, Gauderman W.J., Cozen W., Mack T.M., (2007) Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* **69**: 381-388.
- Jeffery D.R.**, Alshami E., (1998) Allogenic bone marrow transplantation in multiple sclerosis. *Neurology*. **50** (suppl. 4): A147. In: Herndon R.M.(eds.). *Multiple sclerosis: diagnosis, medical management and rehabilitation*. New York Demos, 2000: 35-36.
- Kamen D.L.**, Cooper G.S., Bouali H., Shaftman S.R., Hollis B.W., Gilkeson G.S., (2006) Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* **5**: 114-7.
- Kampman M.T.**, Brustad M., (2008) Vitamin D: a candidate for the environmental Effect in Multiple Sclerosis – observations from Norway. *Neuroepidemiology* 2008 **30**: 140-146.
- Kampman M.T.**, Wilsgaard T., Mellgren S.I., (2007) Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Artic Circle. *J. Neurol.* **254**: 471-477.
- Kimball S.M.**, Ursell M.R., O'Connor P., Vieth R., (2007) Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**: 645-651.
- Koch-Henriksen N.**, Hyllested K. (1988) Epidemiology of multiple sclerosis: incidence and prevalence rates in Denmark 1948-64 based on the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Acta Neurol Scand.* **78**: 369-380.
- Koch-Henriksen N.**, (1999) The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow-up. *Mult Scler.* **5**: 293-296.
- Kurtzke J.F.** (1967) On the fine structure of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol scand* **43**: 257-282.
- Kurtzke J.F.** (2000) Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol. Sci.*; **21**: 383-403.
- Levin L.I.**, Munger K.L., Rubertone M.V., et al., (2005) Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA.* **293**: 2496-2500. In: **De Jager P.L.**, Simon K.C., Munger K.L., Rioux J.D., Hafler D.A., Ascherio A., (2008) Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein – Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology.* **70**: 1113-1118.
- Lundmark F.**, Duvefelt K., Iacobaeus E., Kockum I., Wallstrom E., et al., (2007) Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet.* In: Romagopalan S.V, Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis- associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics.* **5**(2): e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.
- Lycke J.**, Svennerholm B., Hjelmquist E., et al., (1996) Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double blind study. *J. Neurol.* **243**: 214-224. In: Herndon R.M.(eds.). *Multiple sclerosis: diagnosis, medical management and rehabilitation*. New York Demos, 2000: 35-36.
- Mahon B.D.**, Gordon S.A., Cruz J., Cosman F., Cantorna M.T., (2003) Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *Journal of Neuroimmunology* **134**: 128-132.
- Mark B.L.**, Carson J.A., (2006) Vitamin D and autoimmune disease-implications for practice from the multiple sclerosis literature. *J Am Diet Assoc.* **106**: 418-24.
- Mayr W.T.**, Pittock S.J., McClelland R.L., et al., (2003) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology.* **61**: 1373-1377.
- McDonald W.I.**, Compston A., Edan G., et al., (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **50**: 121-127. In: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 11.
- Milanov I.**, Topalov N., Kmetski T., (1999) Prevalence of multiple sclerosis in Gypsies and Bulgarians. *Epidemiol.* **18**: 218-222. In: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 214
- Munger K.L.**, Levin L.I., Hollis B.W., Howard N.S., Ascherio A., (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* **296**: 2832-2838.
- Munger K.L.**, Zhang S.M., O'Reilly E., Hernan M.A., Olek M.J., Willet W.C., Ascherio A., (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* **62**: 60-65.
- Plugliatti M.**, Sotgin S., Rosati G. (2002) The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.*; **104**: 182-191.
- Plugliatti M.**, Rosati G., Carton H., Riise T., et al., (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology.* **13**: 700-722.
- Ponsonby A.L.**, McMichael A., van der Mei I., (2002) Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology*; **181-182**: 71-8.
- Raine C.S.**, McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 10-19.
- Romagopalan S.V.**, Ebers G.C., (2008) Genes for multiple sclerosis. *Lancet* **371**: 283-285. In: Romagopalan S.V, Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis- associated MHC class II

allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics*. **5(2)**: e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.

**Romagopalan S.V.**, Maugeri N.J., Handunnetthi L., et al., (2009) Expression of the Multiple Sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by Vitamin D. *PLoS Genetics*. **5(2)**: e1000369. doi:10.1371/journal.pgen.1000369.

**Rosati G.**, (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol. Sci.* **22**: 117-139. In: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 214.

**Sanders V.J.**, Felisan S., Waddell A., Tourtellotte W.W. (1996) Detection of herpesviridae in post-mortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J. Neurovirol.* **2**: 249-258. In: Herndon R.M.(eds.). *Multiple sclerosis: diagnosis, medical management and rehabilitation*. New York Demos, 2000: 35-36.

**Schwarz S.**, Leweling H., (2005) Multiple sclerosis and nutrition. *Mult. Scler.* **11**: 24-32.

**Smolders J.**, Damoiseaux J., Menheere P., Hupperts R., (2008) Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *Journal of Neuroimmunology* **194**: 7-17.

**Soilu-Hanninen M.**, Laaksonen M., Laitinen I., Eralinna J.P., Lilius E.M., Mononen I., (2007) A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact PTH levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. Doi: 10.1136/jnnp.2006.105320 published online 19 Jun 2007.

**Sundstrom P.**, Juto P., Wadell G., et al., (2004) An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. **62**: 2277-2282. In: **De Jager P.L.**, Simon K.C., Munger K.L., Rioux J.D., Hafler D.A., Ascherio A., (2008) Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein – Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology*. **70**: 1113-1118.

**Van der Mei L.A.**, Ponsonby A.L., Dwyer T., Blizzard I., Simmons R., Taylor B.V., Butzkueven H., Kilpatrick T., (2003) Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* **327**: 316.

**Vieth R.**, et al., (2007) The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am. J. Clin. Nutr.* **85(3)**: 649-650.

**Wallin M.T.**, Page W.F., Kurtzke J.F. (2004) Multiple Sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex and geography. *Ann Neurol.* **55**: 65-71. In: Raine C.S., McFarland H.F., Hohfeld R., (eds.). *Multiple Sclerosis: a comprehensive text*. Elsevier, 2008. 131.

**Weiner L.P.**, Shubin R.A., Fleming J.O. (1994) Mechanisms of virus-induced demyelination and the relationship to multiple sclerosis. In: Herndon R.M., Seil F.J. (eds.). *Multiple sclerosis: current status of research and treatment*. New York Demos, 1994: 67-78.

**Welch A.A.**, Lund E., Amiano P., (2002) Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* **5**: 1273-1285.

**Wingerchuck J.A.**, Lesaux J., Rice G.P., Kremenchutzky M., Ebers G.C., (2005) A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**: 1294-1296.

**Yao S.**, Sriram S., Mitchell W., Stratton C., Tharp A., (1998) CNS infection with *C. pneumoniae* in MS. *Neurology*. **50 (suppl. 4)**: A423. In: Herndon R.M.(eds.). *Multiple sclerosis: diagnosis, medical management and rehabilitation*. New York Demos, 2000: 35-36.

**Zitterman A.**, (2003) Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br. J. Nutr.* **89**: 552-572.