



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
BIOMEDICHE**

*Direttore della Scuola: Prof.ssa Franca Deriu*

**INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE**

*Responsabile di Indirizzo: Prof.ssa Maria Speranza Desole*

**XXVI CICLO**

**IL CONTRIBUTO DELLA VITAMINA D NEL RISCHIO DI  
SCLEROSI MULTIPLA  
ATTRAVERSO LA DIETA. STUDIO CASO-CONTROLLO  
BASATO SU POPOLAZIONE**

***Direttore:***

Prof.ssa Franca Deriu

***Tutor:***

Prof.ssa Maura Pugliatti

***Tesi di dottorato di:***

Dott.ssa Stefania Leoni

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2012/2013 XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

INTRODUZIONE.....	3
<i>La sclerosi multipla</i> .....	3
<i>Diagnosi</i> .....	5
<i>Sintomatologia</i> .....	6
<i>Decorso clinico</i> .....	7
<i>Terapia</i> .....	7
EZIOLOGIA.....	9
INCIDENZA E PREVALENZA.....	14
VITAMINA D.....	22
<i>Metabolismo della vitamina D</i> .....	22
<i>Azioni della vitamina D</i> .....	22
<i>Apporto di vitamina D</i> .....	23
<i>Vitamina D nei pazienti SM</i> .....	24
MATERIALE E METODI.....	25
RAZIONALE DELLO STUDIO.....	26
<i>Popolazione studiata</i> .....	27
<i>Analisi statistica</i> .....	28
RISULTATI.....	29
DISCUSSIONE.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	38
RINGRAZIAMENTI.....	45

## INTRODUZIONE

### *La sclerosi multipla*

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale (CNS) caratterizzata da un prominente coinvolgimento dei nervi ottici, della sostanza bianca periventricolare, del tronco encefalico e del midollo spinale, che può portare a grave disabilità per il coinvolgimento dei sistemi motorio, sensitivo, cerebellare, sfinterico e cognitivo. La maggior parte dei pazienti sperimenta un decorso recidivante-remittente prima di manifestare una disabilità permanente. La SM colpisce approssimativamente 1-2 ogni 1000 persone di origine Nord-Europea, e si contano circa un milione di casi nel mondo (Kurtzke, 1975; Ebers e Sadovnick, 1998). E' una malattia dei giovani adulti con un'età media all'esordio di circa 30 anni. Può essere considerata la più importante malattia neurologica disabilitante con una tendenza a colpire il sesso femminile due volte maggiormente rispetto a quello maschile. Fattori genetici sono coinvolti nella SM, come si rileva dal riscontro di un rischio fino a 20 volte maggiore di sviluppare la malattia nei familiari dei pazienti affetti rispetto a quello rilevato nella popolazione generale e un grado di concordanza del 25-30% nei gemelli omozigoti rispetto al 4% per i gemelli eterozigoti e per i fratelli non gemelli (Ebers et al, 1986). La SM è molto più diffusa fra persone di origine Nord-Europea e molto meno comune in quelle di origine Asiatica e Nord-Americana riflettendo

anche in questo senso una predisposizione genetica (Kurtzke, 2000). L'associazione fra certi alleli del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che si trova sul cromosoma 6 nell'uomo, in particolare l'antigene leucocitario umano (HLA), e la SM fornisce la prima diretta evidenza che supporta il contributo genetico alla malattia (Jersild et al, 1972; Olerup e Hillert 1991; Yamasaki et al, 1999). Fra i Caucasici, individui con HLA-DR2 hanno un rischio 3-4 volte maggiore di sviluppare la SM rispetto ad individui con altri aplotipi. In Sardegna, è stata dimostrata una associazione diversa fra l'HLA e la malattia. Da alcuni studi (Marrosu et al, 1997) è emersa un'associazione fra la SM e gli aplotipi HLA DR3 e DR4. La rivisitazione di tali studi ha tuttavia mostrato una più complessa associazione con 4 diversi alleli HLA, alcuni dei quali precedentemente descritti come potenzialmente protettivi verso la suscettibilità alla malattia (Marrosu et al, 2001). Studi epidemiologici e screening genomici completi hanno tuttavia indicato che i fattori genetici non sono sufficienti per spiegare la suscettibilità alla SM. La distribuzione non casuale della SM con un gradiente nord-sud esiste indipendentemente dai fattori genetici, così come la presenza di regioni geograficamente vicine ma con un diverso tasso di malattia. I dati sulla prevalenza riportati in base alla migrazione non permettono alcuna conclusione chiara riguardo alla predisposizione genetica alla sclerosi multipla, tuttavia la presenza di un fattore ambientale, ancora ignoto, è stata suggerita in maniera chiara, e la maggioranza (70-75%) dei gemelli monozigoti rimane discordante per SM, nonostante anche la condivisione di un ambiente comune durante l'infanzia. La maggior parte dei pazienti con SM non condividono gli stessi alleli HLA-DR e

nel determinare la suscettibilità ereditaria possono interagire diversi geni (Ebers et al, 1996; Haines et al, 1998). Il contributo dei geni HLA alla suscettibilità alla malattia è stimato in una percentuale inferiore al 10% (Risch, 1987). La SM è stata osservata in forma epidemica nelle isole del Nord Atlantico in particolare nelle isole Faroe (Kurtzke et al, 1982; 2000), indicando che non solo la SM potrebbe essere una malattia acquisita, ma anche una malattia trasmissibile, molto probabilmente trasmessa da un virus, ancora indefinito (Sibley et al, 1985; Anderson et al, 1993; Kurtzke, 2000). D'altra parte gli studi sugli adottivi e sui fratellastri hanno mostrato che l'aggregazione familiare della SM è geneticamente determinata e che l'ambiente condiviso non ha un effetto chiaramente quantificabile, supportando così un ruolo critico per quanto riguarda i fattori genetici (Ebers et al, 1995; Sadovnick et al, 1996). In generale, possiamo dire che la SM non può essere spiegata da un singolo fattore: genetico o ambientale. Piuttosto la SM è molto probabilmente una malattia complessa nella quale sia fattori genetici che fattori ambientali hanno un ruolo chiave. Inoltre, la SM è una malattia con una profonda complessità nel decorso clinico, nella suscettibilità genetica, nel pattern delle lesioni patologiche, nell'attività immunologica e nella risposta alla terapia, tutti elementi che riflettono la grande eterogeneità genetica e immunopatologica nella SM (Archelos et al, 2000; Lucchinetti et al, 2000).

### *Diagnosi*

La diagnosi si basa su dei precisi criteri diagnostici. Quelli attualmente in uso sono i Criteri di Polman del 2010. La valutazione del paziente comprende un'attenta anamnesi, l'esame neurologico ed esami

paraclinici che mostrano: lesioni infiammatorie e perdita assonale (risonanza magnetica), deficit della conduzione nervosa (potenziali evocati multimodali) e sintesi intratecale di bande oligoclonali IgG (nel liquido cefalo-rachidiano).

#### *Sintomatologia*

Le manifestazioni cliniche comprendono sintomi motori, sensitivi, visivi ed autonomici. Pochi sintomi clinici sono specifici di malattia, ma particolarmente caratteristici sono il segno di Lhermitte (sensazione di scossa elettrica lungo la colonna vertebrale con la flessione del collo) e il fenomeno di Uhthoff (transitorio peggioramento dei sintomi quando con l'aumento della temperatura corporea). La frequenza dei sintomi varia sensibilmente col variare dell'età con una preponderanza di disturbi visivi nei casi con esordio al sotto dei 20 anni, mentre più tardi risulta preponderante il deficit motorio. Nella maggior parte dei casi il sintomo iniziale è un'ipostenia ad uno o più arti (40% dei casi), turbe del visus, es., da neurite ottica retrobulbare (22%), un disturbo oggettivo della sensibilità, tipo parestesie e disestesie (21%), diplopia, vertigine o disturbi della minzione; nei casi avanzati, invece sono costantemente presenti i disturbi motori, la spasticità, l'atassia, le turbe della sensibilità, i deficit visivi e le turbe sfinteriche. Spesso si associa anche un aumento del tono muscolare, con vari gradi di spasticità soprattutto agli arti inferiori. Le atrofie muscolari possono essere del tutto assenti ma compaiono al perdurare della sintomatologia deficitaria motoria. Il disturbo sensitivo, spesso associato a quello motorio, può presentarsi con una certa variabilità di sintomi soggettivi descritti come sensazioni di parestesie formicolari, di 'fastidio', di pesantezza, di puntura, di

fasciatura, d'intorpidimento. La fatica è sintomo molto comune e la maggior parte dei pazienti si lamenta di un eccessivo affaticamento che compare anche dopo limitate e banali attività. I disturbi sfinterici risultano molto comuni. Il sintomo più frequentemente segnalato è l'urgenza minzionale (24-86% di tutti i sintomi lamentati da pazienti con disfunzione vescicale) (Loeb, 2007). I disturbi sessuali sono rari all'esordio della malattia ma si presentano col passare del tempo. Tra i disturbi affettivi, la depressione è il sintomo più frequente.

#### *Decorso clinico*

L'80% dei pazienti presenta un episodio acuto che colpisce un'unica sede o occasionalmente più sedi. Se questo è accompagnato da anomalie della sostanza bianca alla risonanza magnetica in sedi clinicamente non colpite, la possibilità di un secondo attacco aumenta del 50% a 2 anni sino all'82% a 20 anni (Fisniku et al, 2008). La frequenza di ricadute è di circa 1,5 all'anno. Con il tempo il recupero da ogni episodio è incompleto e si accumulano gli esiti. Nel 20% dei pazienti il decorso è progressivo dall'inizio, nel 65% arriva alla fase secondariamente progressiva (Confavreux e Vukusic, 2006). L'evoluzione clinica è comunque di diverse decadi e la morte è attribuibile nei 2/3 dei casi alla SM e all'aumentato rischio di infezioni, in particolare cutanee, polmonari, vescicali, in pazienti con disabilità avanzata. Il tempo medio è di circa 30 anni dall'esordio con un'aspettativa di vita ridotta di 5-10 anni (Brønnum-Hansen et al, 2004).

#### *Terapia*

Quest'ultimo ventennio ha segnato una vera rivoluzione nella terapia della SM: due farmaci, l'interferone beta (IFN  $\beta$  e il GA) (Racke, 2010;

Kieseier, 2011) sono risultati efficaci nel modificare favorevolmente il decorso della malattia, numerose altre terapie hanno mostrato una potenziale efficacia in studi preliminari e altre nuove modalità terapeutiche sono in fase di valutazione. I farmaci di cui disponiamo sono in grado di ridurre l'attività della malattia e influenzarne positivamente il decorso, ma sono ben lungi dal costituire una soluzione del problema. Innanzitutto l'efficacia di queste terapie è stata dimostrata solo per alcuni tipi di decorso; secondariamente la frequenza degli attacchi è in media ridotta di circa un terzo e l'accumulo di disabilità è solo marginalmente influenzato; infine la risposta alle terapie è risultata alquanto variabile da paziente a paziente e i fattori di previsione e definizione della risposta clinica appaiono ancora assai mal definiti. Queste terapie non hanno un effetto di riduzione del numero di cellule immunocompetenti, ma esplicano la loro azione influenzando su uno o più livelli della complessa regolazione del sistema immunitario. Un limite comune a questo gruppo di farmaci è che le azioni esplicate, pur risultando vantaggiose nei pazienti con SM, non possono essere considerate specifiche per questo tipo di malattia. Per alcuni di questi farmaci inoltre i meccanismi di azione non sono ancora del tutto noti. Gli effetti collaterali di questi farmaci sono strettamente legati alla loro scarsa specificità, essi inducono infatti una ridotta funzionalità del sistema immunitario sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo e un aumento del rischio di contrarre infezioni opportunistiche. Inoltre, la radicale alterazione dell'omeostasi immunitaria potrebbe essere, a lungo termine, un importante cofattore nell'induzione di altre patologie autoimmuni. I farmaci immunomodulanti possono agire sul sistema

immunitario sia riducendo il numero e/o la funzionalità delle cellule T proinfiammatorie e/o delle cellule B, sia interferendo con i processi che regolano la migrazione delle cellule immunitarie nel SNC. Dal Giugno del 2006 è in commercio in Europa il natalizumab (Mc Cormack, 2013), un anticorpo monoclonale che lega la subunità alfa-4 delle integrine alfa-4-beta-1 e alfa-4-beta-7 espresse sulla superficie delle cellule T attivate. Il natalizumab è indicato come monoterapia nella SMRR nei pazienti che non hanno risposto alle terapie convenzionali come IFN- $\beta$  e GA oppure nei pazienti con SMRR ad evoluzione rapida. Il farmaco (300mg) viene somministrato endovena in 100cc di fisiologica sotto osservazione medica. Da circa due anni è in commercio il fingolimod (O' Connor et al, 2009) che induce i linfociti a rimanere sequestrati nei linfonodi impedendo loro di migrare nel cervello e nel midollo spinale, attraverso un legame specifico al recettore per la sfingosina SP1: il farmaco attraversa la barriera ematoencefalica e sembra inoltre svolgere una qualche attività ancora sconosciuta sulle cellule gliali. Viene somministrato per via orale.

## **EZIOLOGIA**

Come già accennato nell'introduzione la SM è una malattia multifattoriale il cui tratto potrebbe essere generato dall'interazione di fattori ambientali con una predisposizione su base genetica in un determinato periodo della vita di un individuo (Poser, 2004), come si riscontra in altre condizioni di tipo multifattoriale. Per alcune di queste

malattie i geni candidati sono conosciuti o parzialmente noti ma l'identificazione di fattori ambientali sembra essere più difficile. La sfida più importante degli studi epidemiologici è l'individuazione dei fattori ambientali maggiormente incidenti sul piano eziologico, la definizione del loro grado di associazione con la malattia o con il suo decorso clinico, la distinzione tra un possibile loro effetto principale nel determinare il rischio per la malattia e/o il loro ruolo di modificatori dell'effetto stesso, e l'individuazione del periodo di vita di maggiore suscettibilità e dei gruppi di individui a maggiore rischio. Studi diversi di migrazione indicano che il potenziale rischio per lo sviluppo della malattia si acquisisca nei primi anni di vita, probabilmente prima del quindicesimo anno di età (Wolfson et al, 1993). La migrazione di soggetti giovani da aree ad elevata incidenza per SM verso aree a bassa incidenza avrebbe determinato una riduzione del rischio di malattia nella popolazione migrata, acquisendo cioè il rischio della popolazione o area geografica ospitante (Alter et al, 1978). La regione di nascita e quella di residenza negli anni dell'infanzia e adolescenza, in particolare tra i 5 e i 15 anni, potrebbero rappresentare i luoghi nei quali il soggetto sviluppa il rischio per la SM. Alcuni studi indicano che il potenziale di rischio per lo sviluppo della malattia si collochi prima del quindicesimo anno di età e probabilmente nei primi anni di vita. Ad esempio, concordanti evidenze indicano che la migrazione da un'area ad alto rischio verso un'area a basso rischio di soggetti molto giovani determini una riduzione del rischio di malattia (Alter et al, 1978). Sono invece meno numerosi i dati a favore dell'aumento del rischio di SM associato con la migrazione da un'area a basso rischio ad un'area ad alto rischio. È dunque suggerita

l'esistenza di un'età critica di esposizione a possibili fattori di rischio causali correlati all'ambiente ad un'età compresa tra infanzia e adolescenza, e verosimilmente sulla base di una predisposizione genetica. Lavori sulla stagionalità delle nascite hanno mostrato, tra i soggetti con SM, un picco delle nascite nei mesi primaverili ed estivi, in particolare tra Aprile e Settembre (Sotgiu et al, 2006), portando a considerare ancora il possibile ruolo eziologico di fattori ambientali in età perinatale, o addirittura esclusivamente prenatale. Analogamente si è osservato un trend stagionale delle riacutizzazioni cliniche (infiammatorie) della SM inquadrabile con l'azione di agenti, forse virali anche comuni, sul disordine immuno-mediato (Pugliatti et al, 2009) L'identificazione di aggregati spazio-temporali di malattia rappresenta un approccio per studi sulla storia naturale della malattia con riferimento all'individuazione del suo periodo di suscettibilità e di eventuali fattori esogeni (tra cui gli ambientali) che possono giocare un ruolo nell'eziologia della SM. Un'analisi di aggregati spazio-temporali (*space-time clusters*) è stata effettuata dal nostro gruppo di ricerca in collaborazione con l'Università di Bergen, Norvegia, sulla popolazione sarda settentrionale (Pugliatti et al, 2006). L'analisi si è basata sulla rilevazione di cambiamenti di residenza dalla nascita all'esordio clinico della malattia per soggetti con esordio di malattia nel periodo tra il 1965 e il 1999, e sulla definizione di aggregato spaziale (*closeness in space*) relativamente alla residenza nello stesso comune, e di aggregato temporale (*closeness in time*) relativamente al condividere lo stesso anno di nascita, o lo stesso quinquennio di nascita ( $\pm 1, 2$  o  $5$  anni). Scopo ultimo dell'analisi di cluster spazio-temporale è quello di determinare se

soggetti nati vicini nel tempo hanno anche risieduto nella stessa area geografica, rispetto a quanto avrebbe potuto verificarsi per caso. Questi studi sono quindi in grado di evidenziare fenomeni di tipo epidemico e sono in particolare utilizzati per malattie trasmissibili (es., infettive). Il lavoro ha mostrato un significativo aggregato spazio-temporale nella primissima infanzia (1-3 anni), soprattutto per coorti recenti, nella popolazione femminile e tra pazienti con età precoce di esordio e un decorso di tipo recidivante-remittente. Questi dati hanno suggerito che in questa popolazione e con queste caratteristiche demografiche, la prima infanzia rappresenti il periodo di suscettibilità alla malattia, o per esposizione a fattori di rischio o per mancata esposizione a fattori di protezione. Nessun aggregato spazio-temporale è stato osservato applicando il modello in maniera retrograda, cioè dall'età di esordio clinico alla nascita, il che esclude la possibilità di un fattore di rischio con azione a fissa latenza, come potrebbe ipotizzarsi, ad esempio, in presenza di virus specifici. Vale la pena di citare, nonostante i limiti metodologici, anche gli studi ecologici mirati all'analisi della correlazione tra la mappatura della distribuzione di fattori di rischio, ad esempio di tipo geoambientale e quella della distribuzione dell'incidenza di SM (Valera et al, 2013). Sebbene con approccio metodologico differente, queste evidenze appaiono in linea con le precedenti osservazioni sugli studi di migrazione, relativi all'interazione dei fattori ambientali con l'età di esposizione (Wolfson et al, 1993). Importante e ulteriore implicazione derivante da questi studi è l'ipotesi fondata di un periodo di latenza di notevole durata (20-40 anni) tra l'acquisizione del tratto per la SM e il suo esordio clinico (Wolfson et al, 1993).

L'aumentata incidenza della SM in numerose regioni del mondo, l'interessamento sempre più frequente della popolazione femminile e l'occidentalizzazione del fenotipo clinico nelle popolazioni orientali (Osoegawa et al, 2009) pone l'attenzione sul ruolo di fattori ambientali nel determinare il rischio per la malattia, con particolare riguardo allo stile di vita e agli effetti della sua 'globalizzazione'. Tra i fattori di rischio ambientali che maggiormente spiegano la varianza della distribuzione della SM nelle popolazioni occidentali (caucasiche) vi sono un'insufficienza di vitamina D, l'abitudine al fumo di sigaretta in particolare in età giovanile e l'esposizione all'infezione da virus di Epstein Barr (EBV) (Correale et al, 2013). Con riferimento a quest'ultimo fattore, sono stati riscontrati pattern genetici legati all'infezione da EBV (Lincoln et al, 2009). E' interessante notare che l'abitudine al fumo di sigaretta sembra impattare sul rischio non solo nei soggetti fumatori in modo attivo, ma anche in coloro che sono stati esposti al fumo passivo o perfino durante la gravidanza materna (*parental smoking*), in associazione, tra l'altro, con la forma pediatrica di SM (Lincoln et al, 2009). Bambini i cui genitori fumatori hanno l'abitudine di fumare all'interno della mura domestiche presentano un rischio aumentato di sviluppare la SM in età giovanile (Montgomery et al, 2008). Studi recenti mettono in risalto il ruolo della flora intestinale nelle malattie immuno-mediate e come macrobioti giochino un ruolo in quelle con interessamento del SNC (Collins et al, 2012). La stessa SM sembrerebbe meno frequente nelle popolazioni caratterizzate da un alto tasso di parassitosi infantili (Collins et al, 2012). È in corso di determinazione la composizione della flora batterica intestinale 'a

rischio' e da quali altri fattori, ad esempio esposizione all'allattamento al seno materno o la dieta nei primi anni di vita, questa possa essere condizionata. La preponderanza della malattia tra le donne suggerisce che fattori ormonali possano essere determinanti nello sviluppo e nel decorso della malattia (Rook, 2012). Studi epidemiologici condotti secondo premesse concettuali diverse e con diversa metodologia hanno tuttavia prodotto risultati compatibili con l'idea che la suscettibilità alla SM si sviluppi durante la vita intrauterina, la prima infanzia e l'adolescenza. Il ruolo di alcuni fattori comunemente distribuiti nella popolazione, quali l'esposizione alla luce solare, il fumo di sigaretta e infezioni dell'infanzia, parrebbe interagire con le prime fasi di vita, 'perturbando' la risposta immunitaria o la corretta evoluzione del sistema nervoso centrale, fino a determinare il tratto per la malattia demielinizzante.

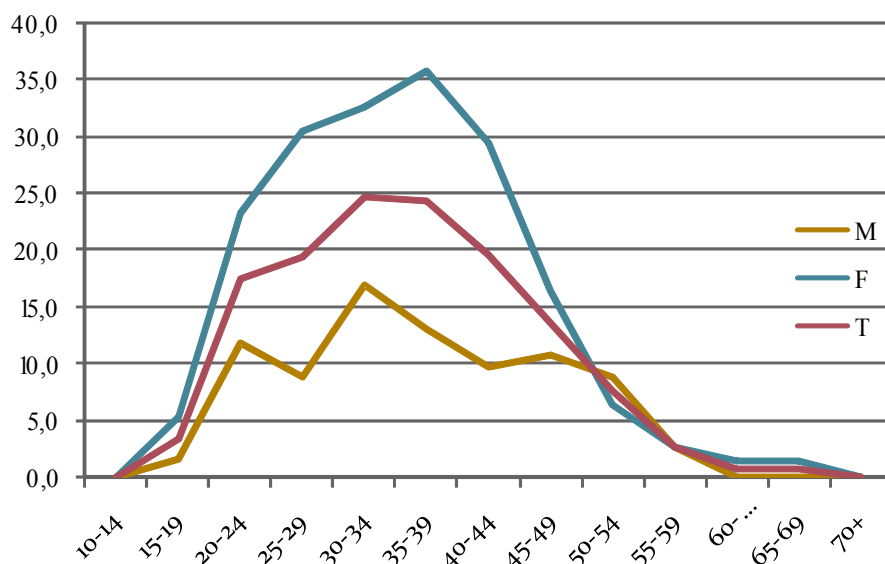
## **INCIDENZA E PREVALENZA**

I dati più recenti sulla prevalenza della malattia mettono in evidenza le differenze nella distribuzione geografica. Nelle popolazioni Asiatiche, come quelle della Siberia e del Giappone, l'affezione è rara. La malattia è rarissima sia in India che in Cina. Difficile, invece, la valutazione riguardo la Russia a causa del suo vasto territorio, delle importanti differenze etniche della popolazione, nonché dei grandi tassi migratori. Sebbene in tutto il continente americano la prevalenza della SM sia rara, è stato rilevato un gradiente da est a ovest nella distribuzione della malattia; il rischio più alto è stato riscontrato tra i discendenti dei Caucasicci, dimostrando che i geni dell'antica popolazione hanno

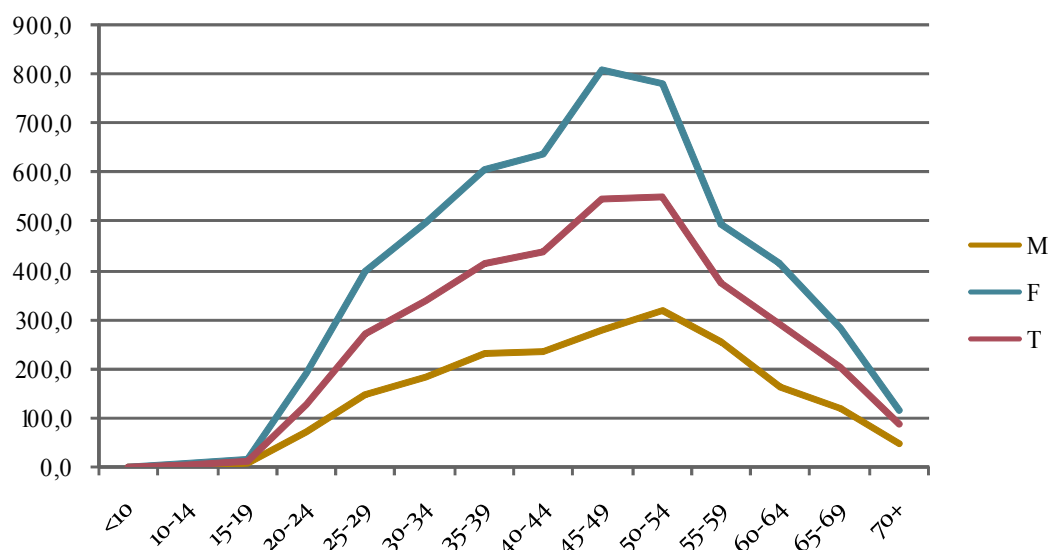
influenzato la suscettibilità genetica. Per quanto riguarda l’Africa si era addirittura pensato che la SM non esistesse tra i neri; oggi è stato, invece, dimostrato qualche raro caso. In Europa, tra i paesi alla stessa latitudine, la nazione col rischio più basso è la Francia. Un alto rischio della malattia lo si riscontra tra gli Scandinavi ed anche in Scozia si raggiungono tassi di prevalenza elevati. In Australia la distribuzione della malattia segue un gradiente nord-sud, con modello di distribuzione latitudine-collegato il quale non è attribuibile all’Europa. Si può affermare che la SM è frequente nelle regioni a clima temperato e meno comune nei tropici, nelle regioni sub-tropicali e nelle aree molto fredde. È vero anche che l’incidenza della SM, esprimendo il gettito annuale di malattia nelle popolazioni, appare notevolmente irregolare nella sua distribuzione zonale e si dimostra non statica, ma variabile nel tempo. Anche il confronto tra studi di incidenza non è semplice, proprio a causa di fattori di confondimento: tra questi vanno annoverati le dimensioni del paese, la provenienza etnica della popolazione, gli effetti delle migrazioni, le peculiarità socio-culturali, la composizione per sesso e classi di età. Ovviamente bisogna prendere anche in considerazione tutte le procedure diagnostiche adottate piuttosto che i criteri diagnostici. È fuori dubbio, tuttavia, che il modello di distribuzione della SM nel mondo suggerisce, attraverso le ampie variazioni dei tassi di incidenza osservati nelle varie aree geografiche, che il rischio della malattia è anche ambiente-correlato. La malattia, come accennato prima, è indubbiamente più frequente nelle regioni abitate da Caucasicci. La SM, probabilmente originatasi nell’Europa nord-occidentale, si è successivamente diffusa in tutto il vecchio continente, in Nord America,

Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda (Pugliatti et al, 2002; Tabella 1 e 2). La Sardegna è un'area ad alto rischio per SM. La prevalenza è notevolmente aumentata negli ultimi anni: 102,6 per 100.000 abitanti nel 1991, 144,4 nel 1997 (Pugliatti et al, 2001). Anche l'incidenza annua della malattia è cresciuta: 2 per 100.000 tra il 1962 e il 1971, 5 tra il 1977 e il 1991 (Rosati et al 1991). Uno studio più recente, condotto presso la Clinica Neurologica dell'Università di Sassari, si è occupato della prevalenza e dell'incidenza della malattia esclusivamente nel territorio del Nord Sardegna (Pugliatti et al, 2005). I risultati hanno dimostrato che, nella provincia di Sassari, all'aumento della prevalenza corrispondeva un contemporaneo aumento dell'incidenza. Mentre la prima può essere influenzata da una migliorata sopravvivenza ciò non accade per la seconda. Il tasso più elevato di incidenza è stato osservato nel territorio Sassarese, a seguire il Logudoro e quello Algherese, e tassi relativamente più bassi in Gallura. Si è potuto evidenziare che le aree più a rischio sono quelle del sud-ovest della provincia di Sassari, quest'area confina con il comune di Macomer, dove nel 1952 la malattia si presentò in forma epidemica; al contrario l'area catalana, considerata linguisticamente e geneticamente diversa dal resto della Sardegna, mostra una diffusione diversa (Pugliatti et al, 2005). Gli ultimi dati relativi al nord Sardegna evidenziano un aumento sia dell'incidenza media annuale (10,8/100.000 abitanti) che della prevalenza (270/100.000 abitanti) con un costante differente rapporto di incidenza della malattia tra uomini e donne, a favore di queste ultime (F:M=2,6) (Leoni et al; manoscritto in lavorazione).

**Figura 1. Incidenza annuale media della SM nel Nord Sardegna (province di Sassari e Olbia-Tempio) nel periodo 1969-2009 per sesso e fasce di età**



**Figura 2. Prevalenza della SM nel Nord Sardegna (province di Sassari e Olbia-Tempio) al 31 Dicembre 2009 per sesso e fasce di età**



**Tabella 1. Incidenza media annuale della SM (100.000 abitanti/anno) in Europa, dal 1955 al 2007**

<b>Referenze</b>	<b>Anno di pubblicazione</b>	<b>Nazione</b>	<b>Popolazione studiata</b>	<b>Periodo di incidenza</b>	<b>Incidenza totale cruda</b>	<b>Incidenza nelle donne</b>	<b>Incidenza negli uomini</b>	<b>F:M</b>
Granieri et al	2000	Italia	Nuoro	1955-1995	4,2	3,3	2,8	1,2
Moreau et al	2000	Francia	Djion	1993-1997	4,3	6,1	3,3	1,8
Salemi et al	2000	Italia	Bagheria	1985-1994	4,4	5,7	3,1	1,8
Grimaldi et al	2001	Italia	Enna	1986-1995	5,7	6,1	5,1	1,2
Ford et al	2002	UK	Leeds	1996-1998	6,1	.	.	
Hernandez	2002	Spagna	La Palma	1995-1998	2,3	.	.	
Sundstrom et al	2002	Svezia	Vasterbotten	1988-1997	5,2	6,7	3,7	1,8
Modrego et al	2003	Spagna	Bajo Aragon	1994-2002	4,6	.	.	
Piperidou et al	2003	Grecia	Evros	1994-1996	2,4	.	.	
Ranzato et al	2003	Italia	Padova	1980-1999	3,5	4,5	2,7	1,7
Aarseth et al	2004	Norvegia	Nord-Trondelag	1989-1993	5,1	5,1	4,4	1,2
Ragonese et al	2004	Italia	Monreale	1992-2000	4,0	.	.	
Sarasoja et al	2004	Finlandia	Finlandia centrale	1979-1998	5,2	7,0	3,3	2,1
Aladro et al	2005	Spagna	Las Palmas	1998-2002	4,1	6,2	2,0	3,1
Donnan et al	2005	Scozia	Tayside	1970-1997	7,2	.	.	
Pugliatti et al	2005	Italia	Sassari	1965-1999	4,6	6,5	2,6	2,5

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2012/2013 XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Referenze	Anno di pubblicazione	Nazione	Popolazione studiata	Periodo di incidenza	Incidenza totale cruda	Incidenza nelle donne	Incidenza negli uomini	F:M
Alonso	2007	UK	UK	1993-2000	5,5	7,4	3,4	2,2
Debouverie et al	2007	Francia	Lorraine	1990-2002	5,5	7,6	3,2	2,3
Granieri et al	2007	Italia	Ferrara	1990-2003	4,4	5,9	2,6	2,3
Grimaldi et al	2007	Italia	Caltanissetta	1993-2002	9,2	11,5	6,6	1,7
Papathanasopoulos et al	2008	Grecia	Grecia (ovest)	2002-2006	10,7	.	.	
Smestad et al	2008	Norvegia	Oslo	2001-2005	6,6	.	.	
Joensen	2009	Danimarca	Isole Faroe	1986-2007	4,5	4,9	3,3	1,5
Krokki et al	2010	Finlandia	Ostrobothnia	1992-2007	6,3	8,6	3,9	2,2
Nicoletti et al	2010	Italia	Catania	2000-2004	7,0	8,4	5,3	1,6
Vatne et al	2010	Norvegia	Vest-Adger	2001-2006	7,5	9,6	5,1	1,9
Cocco et al	2011	Italia	Sardegna (sud-ovest)	2003-2007	9,7	14,6	4,7	3,1
Eliasdottir et al	2011	Islanda	Islanda	2002-2007	7,6	11,5	3,8	3,0
Fromont et al	2011	Francia	Francia	2000-2007	7,8	10,9	4,4	2,5

**Tabella 2. Prevalenza della SM (per 100.000 abitanti) in Europa, dal 1993 al 2008**

<b>Referenze</b>	<b>Anno di pubblicazione</b>	<b>Nazione</b>	<b>Popolazione studiata</b>	<b>Anno di prevalenza</b>	<b>Prevalenza totale cruda</b>	<b>Prevalenza nelle donne</b>	<b>Prevalenza negli uomini</b>	<b>F:M</b>
Granieri et al	2000	Italia	Provincia di Nuoro	1994	151,90	270,60	94,90	2,8
Pugliatti et al	2001	Italia	Provincia di Sassari	1997	144,40	205,10	82,50	2,5
Ford et al	2002	UK	Leeds	1999	108,70	.	.	
Hernandez	2002	Isole Canarie	La Palma	1998	42,00	60,00	22,00	2,7
Materljan et al	2002	Croazia	Gorski kotar	2001	142,10	.	.	
Sundstrom et	2002	Svezia	Vasterbotten	1997	154,00	202,00	105,00	1,9
Modrego et al	2003	Spagna	Bajo Aragon	2003	75,00	99,70	50,00	2,0
Ranzato et al	2003	Italia	Padova	1999	80,50	111,10	49,70	2,2
Aarseth et al	2004	Norvegia	Nord-Trondelag	2000	163,60	204,80	122,60	1,7
Ragonese et al	2004	Italia	Monreale	2000	71,20	93,00	48,50	1,9
Sarasoja et al	2004	Finlandia	Finlandia centrale	2000	105,00	.	.	
Aladro Y et al	2005	Spagna	Las Palmas	2002	77,50	113,80	39,60	2,9
Solaro et al	2005	Italia	Genova	1997	94,00	118,00	67,00	1,8

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2012/2013 XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Bergamaschi et al	2006	Italia	Pavia	2005	94,00	117,00	68,00	1,7
Grytten et al	2006	Norvegia	Hordaland	2003	150,80	191,30	109,80	1,7
Ares et al	2007	Spagna	Santiago	2003	78,70	91,60	64,10	1,4
Granieri et al	2007	Italia	Ferrara	2004	120,93	164,26	73,59	2,2
Grimaldi et al	2007	Italia	Caltanissetta	2002	165,80	218,00	107,60	2,0
Klupka-Saric et al	2007	Yugoslavia	Herzegovina	2003	27,00	30,00	23,00	1,3
Gray et al	2008	Irlanda	Nord est	2004	230,60	300,80	157,00	1,9
Papathanasopoulos et al	2008	Grecia	Grecia (ovest)	2006	119,61	.	.	
Bentzen et	2010	Danimarca	Danimarca	2005	173,30	229,80	115,60	2,0
Krokki et al	2010	Finlandia	Nord Ostrobothnia	2007	103,00	144,00	62,00	2,3
Nicoletti et al	2010	Italia	Catania	2004	127,10	.	.	
Risberg et al	2010	Norvegia	Oppland County	2002	174,10	247,70	98,00	2,5
Ahlgren et al	2011	Svezia	Svezia	2008	188,90	263,60	113,00	2,1
El Adssi et al	2012	Francia	Lorraine	2008	170,90	239,20	99,20	2,4

## VITAMINA D

Tra le numerose ultime scoperte sulle azioni della vitamina D è stato documentato il suo ruolo immunomodulatorio nelle encefalomieliti sperimentali autoimmuni (EAE).

### *Metabolismo della vitamina D*

Dopo la trasformazione del 7-deidrocolesterolo in colecalciferolo (D<sub>3</sub>) nella pelle attraverso l'azione dei raggi ultravioletti B (UVB) o per assunzione diretta di vitamina D<sub>3</sub> (o D<sub>2</sub>), una prima idrossilazione nel fegato catalizzata da diversi enzimi porta alla formazione di 25-OH-D, il metabolita dosato nel sangue per valutare i livelli di vitamina D. Una seconda idrossilazione avviene nel rene, catalizzata dall'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi da cui deriva l'1,25-OH-2D (calcitriolo) (Prosser e Jones, 2004). La vitamina D e i suoi diversi metaboliti vengono trasportati nel sangue dalla proteina legante la vitamina D (Vitamin D binding protein, DBP). Il calcitriolo si dissocia dalla DBP e si lega al recettore specifico per la vitamina D (VDR) e può essere considerato un ormone (Wang et al, 2005; Nino et al, 2008; Pike e Meyer, 2010).

### *Azioni della vitamina D*

I recettori per la vitamina D si trovano in quasi tutte le cellule dell'organismo incluse quelle del SNC: neuroni, oligodendrociti, astrociti e cellule gliali (Walters, 1992). Oltre il suo ben conosciuto ruolo sulla fisiologia del calcio e sul metabolismo osseo, ha anche numerose azione "extra ossee": di protezione del sistema cardiovascolare,

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2012/2013 XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

antiproliferativa (in alcuni tumori), antiinfettiva (immunità innata), antiinfiammatoria (immunità acquisita), un effetto che potrebbe coinvolgerla nelle patologie autoimmuni come il diabete tipo I, il morbo di Crohn, l'artrite reumatoide e la SM (Holick 2004, 2007; Hewison, 2012). Il ruolo specifico del calcitriolo all'interno delle cellule del SNC rimane ancora da chiarire. Potrebbe avere un potenziale nel funzionamento neuronale, nella neuroprotezione e nella mielinizzazione (Wergeland et al, 2011), ma anche nell'immunità innata e acquisita del SNC attraverso i linfociti. Il calcitriolo ha inoltre un effetto sia preventivo che curativo nell'EAE (Lermire e Archer, 1991). L'effetto generale immunomodulatorio della vitamina D nell'uomo è quello che appare influenzare il rischio di sviluppare SM ed il suo decorso (Hewison, 2012). La vitamina D potrebbe potenziare l'immunità innata agendo sui macrofagi e i monociti e regolando l'immunità acquisita in diversi modi (Adorini e Penna, 2008). L'effetto immunomodulatorio ed antiinfiammatorio della vitamina D sembra essere più marcato nelle donne che negli uomini con SM probabilmente per un effetto sinergico tra il calcitriolo e 17- $\beta$ -estradiolo (Correale et al, 2010).

#### *Apporto di vitamina D*

Sulla base delle nuove scoperte metaboliche e patologiche, l'introito giornaliero di vitamina D è stato messo in discussione ed è ora stabilito in 200-400 IU/die, mentre sino a qualche anno fa questo valore veniva considerato insufficiente. Nelle diete normali l'assunzione di vitamina D col cibo o coi cibi fortificati viene considerato marginale e in genere consiste in meno di 100-200 IU/die (Von Geldern e Mowry, 2012).

L'esposizione alla luce solare rimane la principale risorsa naturale di vitamina D, provvedendo alla richiesta giornaliera dell'80/90%. Nelle regioni del Nord la vitamina D può essere sintetizzata nella pelle solo per pochi mesi l'anno e le riserve si esauriscono dopo poche settimane dall'esposizione al sole se non vengono regolarmente ripristinate con l'alimentazione (Hoklick, 2007). Bisogna inoltre considerare che gli stili di vita moderni tendono a ridurre le attività all'aperto di molte persone e di conseguenza l'esposizione al sole. L'esposizione al sole inoltre viene spesso evitata per non incorrere in problemi dermatologici e a questo si aggiunge che le persone con la pelle scura e gli anziani hanno una minore sintesi di vitamina D rispetto alle persone con la pelle chiara e ai giovani (Binkley et al, 2007). Infine le persone in sovrappeso sequestrano parzialmente la vitamina D, che è liposolubile, negli adipociti e questo contribuisce a peggiorarne un'insufficienza (Earthman et al, 2012).

#### *Vitamina D nei pazienti SM*

I livelli sierici di vitamina D tendono a diminuire durante il decorso della malattia. Il fenomeno di Uhthoff (marcata sensibilità al caldo che può scatenare una sintomatologia neurologica) fa sì che alcuni pazienti evitino spontaneamente il sole. Una marcata ipovitaminosi D è stata riscontrata nelle prime fasi di malattia (Pierrot-Deseilligny e Souberbielle, 2010). Recentemente si è inoltre visto che aspetti genetici potrebbero influenzare l'assorbimento della vitamina D nei pazienti SM (Lin et al, 2012).

## MATERIALE E METODI

Il presente lavoro si basa su uno studio internazionale caso-controllo (*An international multicentre case-control study of Environmental Risk Factors In Multiple Sclerosis, EnvIMS*) sulla possibile associazione tra SM ed esposizione a fattori di rischio ambientale. Un questionario ad hoc (EnvIMS-Q), autosomministrato è stato disegnato in diverse lingue e testato per fattibilità, validità culturale, difficoltà nel suo utilizzo sia per quanto riguarda i pazienti che i controlli (Pugliatti et al, 2012). EnvIMS-Q è diviso in diverse sezioni che rappresentano vari fattori di esposizione considerati più interessanti nella ricerca eziologica relativa alla SM: background socio-demografico, dieta, inclusi allattamento e utilizzo di supplementi vitaminici nei primi anni di vita, storia medica con particolare attenzione alle infezioni dell'infanzia e dell'adolescenza, comorbidità, stile di vita (abitudine al fumo di sigaretta, attività fisica), fattori occupazionali (solo per la Norvegia e la Svezia), fattori riproduttivi per le donne. Lo studio EnvIMS è stato condotto in diverse nazioni europee (Italia, Repubblica di San Marino, Serbia, Norvegia e Svezia) e Canada. I risultati relativi allo studio EnvIMS hanno evidenziato una correlazione inversa tra esposizione solare e quindi ridotto apporto di vitamina D e rischio di sviluppare SM. La fascia di età più a rischio è risultata essere quella infantile nella popolazione italiana, quella adolescenziale nella norvegese (Bjørnevik et al, 2013) .

## **RAZIONALE DELLO STUDIO**

Le nostre conoscenze sull'azione della vitamina D e sulla patogenesi della SM si sono sviluppate nel corso degli ultimi 12 anni (Hayes et al 2000 e 2008). E' attualmente riconosciuto che la vitamina D è coinvolta nell'eziologia della SM (Ascherio e Munger, 2007). L'ipoavitaminosi D è un fattore di rischio nello sviluppo di SM (Pierrot-Deseilligny e Souberbielle, 2010). Alcuni lavori suggeriscono che la vitamina D giochi un ruolo chiave nel prevenire il danno alla mielina e nel ripararlo. La carenza di vitamina D può essere causata da una carente esposizione solare o da un ridotto introito con la dieta o coi supplementi (Shaygannejad e Tolou-Ghamari, 2013). Il periodo critico sembra essere l'adolescenza e studi recenti suggeriscono che un adeguato introito di vitamina D con la dieta in questo periodo è protettivo (Munger et al, 2011). La vitamina D si forma nell'organismo con l'azione del sole (Webb et al, 1992). Questa sintesi endogena dipende dallo spessore e dalla pigmentazione della pelle (Matsuoka et al, 1989). La dieta risulta essere una risorsa meno importante di vitamina D. Solo alcuni cibi (pesce, uova, burro, alcuni tipi di carne) contengono un significativo valore di vitamina D. Per gli adulti viene raccomandato un introito con la dieta di vitamina D di 10 µg/die, per i bambini 0-15 µg/die; questo range di valori indica che bambini e adulti sono in grado di produrre in maniera adeguata vitamina D con l'esposizione alla luce solare e non necessitano di supplementi dietetici. Il valore più alto di questo range è basato su una richiesta stimata in individui con una minima sintesi endogena. (Report

of the Scientific Committee for Food, thirty-first series; Nutrient and energy intakes for the European Community, 1992). Pochi studi epidemiologici hanno indagato sulla storia dei pazienti negli anni prima che la patologia esordisse. Obiettivo del nostro studio è stato quello di studiare i pattern dietetici in età tardo adolescenziale (*teen-age*) in soggetti che hanno sviluppato SM rispetto ad una popolazione di riferimento, e il conseguente possibile introito di vitamina D attraverso i suddetti pattern dietetici, al fine di individuare il contributo della dieta nel rischio per SM.

#### *Popolazione in studio*

In questo studio è stata inclusa la popolazione italiana partecipante allo studio EnvIMS. Individui con età uguale o maggiore a 18 anni hanno dato il loro consenso alla partecipazione allo studio, hanno compilato il questionario che gli è stato spedito per posta. I casi sono stati selezionati dal database basato sulla popolazione di pazienti affetti da SM diagnosticati secondo i criteri di Mc Donald (Polman et al, 2005) con un esordio clinico di non oltre precedente a 10 anni dalla raccolta dei dati (1999-2008). Sono stati appaiati quattro controlli per ogni caso in base a sesso ed età, randomizzati da registri di popolazione. Settecentosette (41.8%) dei 1692 casi eleggibili e 1333 (20.8%) dei 6414 controlli hanno fornito il consenso di partecipare allo studio. La proporzione di risposta è stata leggermente più alta nelle donne rispetto agli uomini, sia tra i casi (49.9% and 38.4%) che tra i controlli (23.2% and 19.8%). Le caratteristiche della popolazione sono descritte nella Tabella 3.

**Tabella 3. Caratteristiche della popolazione italiana dello studio EnvIMS**

	<b>Casi (n=707)</b>	<b>Controlli (n=1333)</b>
Età media (DS)	38,8 (10,1)	39,3 (10,7)
Sesso, donne (%)	460 (65,1)	910 (68,3)
Età media (DS) di esordio	33,2 (10,1)	-
Durata media (DS) della SM	5,6 (2,79)	-
Tasso di risposta	707/1692 (43,0%)	1333/6414 (20,8%)

*Analisi statistica*

L'analisi descrittiva ha incluso il calcolo delle medie, deviazioni standard (DS), e il *t-test* per campioni indipendenti per variabili continue. Conte e percentuali sono state utilizzate per descrivere variabili categoriche; il test di  $\chi^2$  per analizzare differenze statistiche nella distribuzione delle suddette variabili. La significatività è stata stabilita con  $p=0,05$ , test a due code. L'associazione tra pattern dietetici e SM è stata misurata attraverso la stima dell'odds ratio (OR), e intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) mediante l'analisi di regressione logistica. La misura del rischio è stata corretta per le seguenti covariate: sesso, abitudine al fumo di sigaretta, esposizione alla luce solare. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., IBM, Somers, New York, USA) versione 19 per Windows.

### *Aspetti etici*

Lo studio EnvIMS ha ricevuto l'approvazione del comitato di bioetica locale (Sassari ASL1: n. 598/L, 26.04.2007 and 11.05.2009; Olbia-Tempio ASL 2: n. 33436, 11.06.2009; Comitato Etico Provincia di Ferrara: n. 11, 18.12.2008).

### **RISULTATI**

Abbiamo valutato la frequenza nel consumo di tutti gli alimenti presenti nel questionario da parte dei casi e dei controlli: yogurt, latte di mucca e di capra, formaggi freschi, stagionati e semi stagionati, carni e salumi (incluse quelle affumicate), wuerstel, pesce fresco, surgelato e affumicato, i vari tipi di pesce (trota, spigole, orate, sardine, acciughe, aringhe, i crostacei, i molluschi). Abbiamo osservato, come descritto nella Tabella 4, che il consumo di alcuni tipi di cibo è più frequente nei controlli rispetto ai casi con una significatività statistica (non sono stati riportati gli alimenti la cui differenza nel consumo non era significativa). Questo è rilevante per quanto riguarda il consumo di pesce surgelato, fresco e affumicato, crostacei e molluschi ed in particolare per i sottotipi di pesce, soprattutto per orate e spigole, sgombro, acciughe, aringhe e sardine e formaggi freschi.

**Tabella 4. Frequenza del consumo di alimenti diversi in casi e controlli (EnvIMS-Q)**

<b>Alimento</b>	<b>Basso consumo<sup>a</sup></b>		<b>Alto consumo<sup>b</sup></b>		<b>P</b>	<b>P for trend</b>
	Casi	Controlli	Casi	Controlli		
Pesce, crostacei, molluschi	44,6	39,8	55,4	60,2	0,042	0,039
Pesce (senza crostacei e molluschi)	68,1	61,3	31,9	38,7	0,04	0,03
Molluschi	83,4	79,6	16,6	20,4	0,045	0,047
Merluzzo	90,6	87,4	9,4	12,6	0,044	0,043
Acciughe, alice, sardine	93,9	90,8	6,1	9,2	0,016	0,019
Orata, spigola	81,1	74,5	18,9	25,5	0,001	0,001
Sgombro fresco	89,7	85,7	10,3	14,3	0,014	0,016
Carne, salumi affumicati, wurstel	14,0	13,0	86,0	87,0	ns	ns
Carne	12,6	10,7	87,4	89,3	ns	ns
Wuerstel	86,1	82,6	13,9	17,4	0,054	0,054
Carne affumicata	79,0	74,7	21,0	25,3	0,041	0,041
Latticini (latte mucca, capra, yogurt, formaggi, affumicati)	5,7	4,5	94,3	95,5	ns	ns
Latte di mucca, yogurt e formaggi non affumicati	5,7	5,0	94,3	95,0	ns	ns
Latte di mucca e formaggi non affumicati	6,5	5,8	93,5	94,2	ns	ns
Latte di mucca	27,2	23,3	72,8	76,7	0,066	0,059
Yogurt	53,8	48,6	46,2	51,4	0,032	0,031
Formaggi freschi	41,2	35,5	58,8	64,5	0,015	0,015

<sup>a</sup> meno di una volta alla settimana; <sup>b</sup> una volta alla settimana o più frequente

E' stata fatta l'analisi dell'associazione tra SM ed esposizione ad alcuni alimenti in età adolescenziale. Al fine di escludere l'effetto di potenziali fattori di confondimento o di identificarne alcuni modificatori dell'effetto, è stata effettuata un'analisi di regressione logistica

considerando il sesso, l'abitudine al fumo e l'esposizione alla luce solare quali covariate (Tabella 5). In particolare, dopo correzione statistica, né il consumo di merluzzo, né di latte di mucca si è trovato associato al rischio per SM.

**Tabella 5. Associazione (OR con IC95%) tra esposizione ad alcuni alimenti in età adolescenziale e rischio per SM**

<b>Alimenti</b>	<b>OR<sub>crudo</sub></b>	<b>IC95%</b>	<b>OR<sub>corr</sub><sup>a</sup></b>	<b>OR<sub>corr</sub><sup>b</sup></b>
Pesce, crostacei, molluschi	0,82	0,68-0,99	0,81 (0,67-0,98)	0,80 (0,65-0,97)
Pesce (senza crostacei e molluschi)	0,74	0,61-0,91	0,76 (0,62-0,93)	0,74 (0,60-0,91)
Wuerstel	0,77	0,59-1,00	0,75 (0,57-0,99)	0,75 (0,56-1,00)
Carne affumicata	0,78	0,62-0,99	ns	0,74 (0,58-0,95)
Molluschi	0,78	0,61-0,99	0,76 (0,59-0,98)	0,70 (0,53-0,92)
Merluzzo	0,72	0,52-0,99	ns	Ns
Acciughe, alici, sardine	0,64	0,43-0,99	0,64 (0,43-0,95)	0,60 (0,40-0,90)
Orata, spigola	0,68	0,54-0,86	0,70 (0,55-0,90)	0,70 (0,55-0,90)
Sgombro fresco	0,69	0,51-0,93	0,68 (0,49-0,92)	0,66 (0,48-0,92)
Yogurt	0,81	0,67-0,98	ns	0,80 (0,65-0,98)

<sup>a</sup> OR corretto per abitudine al fumo di sigaretta, sesso

<sup>b</sup> OR corretto per abitudine al fumo di sigaretta, sesso, esposizione alla luce solare

I soggetti di controllo sono stati esposti ad un consumo più elevato di pesce, inclusi molluschi, rispetto ai soggetti con SM (OR<sub>crudo</sub>=0,82; IC95% 0,68-0,99), e soprattutto al consumo di alcuni tipi specifici di pesce, es., acciughe, alici, sardine, orate, spigole, sgombro fresco. Analogamente si osserva un maggior consumo di carne affumicata e wuerstel nei soggetti di controllo, rispetto ai casi.

Data la rilevanza acquisita del ruolo della vitamina D nella patogenesi della SM, e nel tentativo di conoscerne l'impatto attraverso la dieta nell'ambito del nostro studio, abbiamo quindi stimato l'introito medio di vitamina D nei casi e nei controlli con gli alimenti consumati con maggior frequenza secondo porzioni di riferimento. La Tabella 6 riporta

il contenuto medio di vitamina D per porzione degli alimenti di interesse, come dalla Banca Dati di Composizione degli Alimenti per gli Studi Epidemiologici in Italia (IEO, 2013).

**Tabella 6. Contenuto di vitamina D negli alimenti (Banca dati di composizione degli alimenti per gli studi epidemiologici in Italia)**

<b>Alimenti</b>	<b>Mcg/porzione</b>
Yogurt	0,04
Formaggi freschi	0,14
Wuerstel	0,15
Molluschi	0
Merluzzo	0
Acciughe, alici, sardine	11,80
Orata, spigola	0
Sgombro fresco	3,34
Carne affumicata	0,068

Si evince che non tutti gli alimenti più frequentemente consumati nella popolazione sana di controllo siano ricchi di vitamina D, fatta eccezione per acciughe, alici e sardine. Orate e spigole, invece, presentano un contenuto di vitamina D pari a 0. La stima della quantità totale di vitamina D introdotta attraverso classi di cibi consumati (latticini, carne, pesce) ha mostrato un maggior introito totale medio (DS) di vitamina D nei controlli rispetto ai casi, pur senza significatività statistica: 2,63 (2,8) mcg vs. 2,39 (2,49) mcg. Su tale differenza sembra pesare in particolar modo e come atteso, il consumo di pesce e in particolare questo derivava dal maggior consumo di pesce: 2,74 (3,52) vs. 2,43 (3,12) mcg,  $p=0,065$ . Poiché fonte essenziale di vitamina D, oltre all'esposizione solare, è rappresentata dal consumo di integratori alimentari, è stata studiata la frequenza di uso e la possibile associazione nei pazienti con SM verso i

controlli, rispettivamente, di olio di fegato di merluzzo, capsule di olio di fegato di merluzzo, capsule di olio di pesce e multivitaminici (Tabella 7).

**Tabella 7. Frequenza di consumo e associazione (OR, IC95%) di integratori alimentari in soggetti con SM e di controllo**

Integratori alimentari	Si (%)		No (%)		OR <sub>crudo</sub> <sup>a</sup>	IC95%	p	p for trend
	Casi	Controlli	Casi	Controlli				
Olio di fegato di merluzzo	3,8	6,4	96,2	93,6	1,74	1,06-2,84	0,03	0,02
Capsule di olio di fegato di merluzzo	2,1	2,3	97,9	97,7	ns	-	-	-
Capsule di olio di pesce	0,7	1,5	99,3	98,5	ns	-	-	-
Multivitaminici	33,8	35,4	66,2	64,6	ns	-	-	-

<sup>a</sup>OR<sub>corr</sub> = 1,81 (IC95%: 1,07-3,06; p= 0,027 (corretto per sesso, abitudine al fumo, esposizione alla luce solare)

Solo l'uso di olio di fegato di merluzzo, sebbene infrequente (5,5%) nella popolazione generale, si trova statisticamente associato nei pazienti con SM rispetto ai controlli (OR=1,74; IC95%: 1,06-2,84). L'utilizzo dell'olio di fegato di merluzzo sostanzialmente non modifica le stime di rischio per gli alimenti su indicati (Tabella 5), se non per il consumo di yogurt la cui riduzione non sembra più associarsi alla condizione di SM dopo correzione con questa variabile (dati non presentati).

## DISCUSSIONE

Abbiamo osservato che il consumo di alcuni tipi di cibo è più frequente nei controlli rispetto ai casi. Questo è rilevante per quanto riguarda il

consumo di pesce (es., orate e spigole, sgombro, acciughe, aringhe e sardine), crostacei, molluschi e formaggi freschi.

Per quanto riguarda il consumo di carne non si notano differenze significative tra i controlli e i casi tranne che per il consumo della carne affumicata che è maggiore nei primi. Le differenze non sono significative per quanto riguarda il latte di mucca mentre lo sono per lo yogurt e i formaggi freschi consumati in misura maggiore dalla popolazione dei controlli. L'analisi dell'associazione tra SM e pattern dietetici in età adolescenziale ha mostrato come il maggior consumo di determinati alimenti come il pesce e in particolare acciughe, alici, sardine, orate, spigole, sgombro fresco, merluzzo, latte di mucca, yogurt, carne affumicata e wurstel riveli un  $OR < 1$ , a indicare una protezione verso il rischio di malattia. Né il sesso, l'abitudine al fumo di sigaretta, e l'esposizione alla luce solare sembrano essere in grado di modificare la stima del rischio se non per quanto riguarda il consumo di yogurt.

Sulla base dei risultati e del contenuto di vitamina D per porzione di alimento, non tutti gli alimenti la cui frequenza è superiore nei controlli sono effettivamente ricchi di vitamina D. Ad esempio il merluzzo, i molluschi, le orate e le spigole hanno un contenuto di vitamina D pari a zero. Considerando il contenuto di vitamina D negli alimenti, la stima dell'introito nei casi e nei controlli per classi di cibi (latticini, carne, pesce) è risultata maggiore nei controlli rispetto ai casi e in particolare questo derivava da un maggior consumo di pesce. Pur non avendo osservato una differenza significativa nell'introito medio di vitamina D tra casi e controlli, il valore ottenuto in questi ultimi (2,6 mcg) è in linea con quello raccomandato (dose giornaliera raccomandata, RDA) con la

dieta (Sette et al, 2011). L'utilizzo dell'olio di fegato di merluzzo, seppur raro nella popolazione generale trova un maggior utilizzo da parte dei controlli. Utilizzato come possibile valore di confondimento sostanzialmente non modifica le stime di rischio per gli alimenti analizzati, se non per il consumo di yogurt.

Sebbene diversi alimenti siano stati correlati al rischio di SM in studi caso-controllo, i risultati finora sono stati inconsistenti e poco convincenti. In studi ecologici, sono state trovate delle associazioni tra SM e introito di grassi animali (Alter et al, 1974; Esparza et al, 1995), questo riferito al consumo di carne (Lauer, 1995), latte e burro (Agranoff et al 1974; Lauer, 1995). E' stata trovata inoltre una correlazione inversa tra consumo di pesce e nocciole, risorse di grassi polinsaturi (Agranoff et al, 1974). Un aumentato rischio di SM con un maggior consumo di grassi animali e un effetto protettivo dal consumo di grassi polinsaturato è stato riportato in alcuni studi caso-controllo (Ghadirian et al, 1998), ma i risultati di questi studi non hanno supportato l'associazione tra il consumo di latte e carne e l'aumentato rischio di SM (Ghadirian et al 1998; Butcher 1986) o il diminuito rischio dal consumo di pesce e nocciole (Ghadirian et al, 1998). Un recente studio norvegese (Kampman et al, 2007) ha evidenziato che il consumo di pesce 3 o più volte a settimana in individui che vivono alla latitudine tra il 66° and 71° N è inversamente correlato al rischio di SM. Altri risultati hanno incluso l'associazione inversa tra introito di vitamina C e rischio di SM senza però alcuna associazione con altri antiossidanti o con frutta o vegetali (Ghadirian et al, 1998).

I risultati del nostro studio si collocano all'interno della letteratura sopra citata. In particolare rafforzano l'ipotesi che il consumo di pesce riduca il rischio di sviluppare la SM e che il pattern dietetico in generale giochi un ruolo nel successivo sviluppo della patologia. Il consumo di carne e latte non sembra invece influire sul rischio ma si evidenzia comunque come l'alimentazione dei controlli sia più varia rispetto a quella dei casi. Un altro dato che emerge dal nostro studio e che avvalorata dati già noti, è che il periodo di maggior suscettibilità nei confronti della patologia sia quello adolescenziale. Questi presupposti porrebbero la necessità di poter lavorare su coorti di popolazione, definite per fattori di esposizione (rischio o protezione) sin dalla nascita o persino dalla vita intrauterina, e dati di popolazione al fine di ridurre il potenziale per fattori di confondimento e altri vizi metodologici. L'insufficienza di vitamina D, l'abitudine al fumo di sigaretta, i pattern dietetici sono fattori di rischio modificabili e sui quali è possibile fare prevenzione primaria a livello di popolazione, e contribuire alla prevenzione secondaria nei pazienti stessi. Lo scenario attuale in ambito epidemiologico ci fa propendere a considerare il rischio per SM come modulato da fattori di stile di vita, forse in corso di cambiamento a livello globale, interagenti su una predisposizione genetica. Mentre si aspettano risultati incontrovertibili, i pazienti affetti da SM che hanno una carenza di vitamina dovrebbero assumere dei supplementi, almeno per il loro stato generale di salute, utilizzando dosi moderate di vitamina D.

## **BIBLIOGRAFIA**

Agranoff BW, Goldberg D. Diet and the geographical distribution of multiple sclerosis. *Lancet* 1974;2:1061-1066.

Alter M, Kahana E, Lowensom R. Migration and risk of multiple sclerosis. *Neurology* 1978; 8:239-48.

Alter M, Yamoor M, Harshe M. Multiple sclerosis and nutrition. *Arch Neurol* 1974;31:267-272

Andersen O, Lygner PE, Bergstrom T et al. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study: *J Neurol* 1993;240:417-22.

Archelos J.J., Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:694-706.

Ascherio A and Munger K. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: non infectious factors. *Ann Neurol* 2007; 61: 288-299.

Bjørnevik K, Riise T, Wesnes K et al. An age at exposure effect in association between sun exposure and the risk of MS in Norway and Italy. The EnvIMS study. *MultScler J* 2012;18:(S4)64.

Bromhum-Hansentl H, Koch-Henriksen N, Stenager E. “Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127:844-50

Butcher PJ. Milk consumption and multiple sclerosis—an etiological hypothesis. *Med Hypotheses* 1986;19:169-178

Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews* 2012;11:735-42

Confavreux C and Vukusic S. "Age at disability milestones in MS. *Brain* 2006; 129:595-605

Correale J, Aguirre MEB, Farez MF. Sex-specific environmental influences affecting MS development. *Clinical Immun* 2013 Feb 21 [Epub ahead of print].

Ebers GC and Sadovnick AD. Epidemiology. In Paty DW, and Ebers UC 1998 (eds: Multiple sclerosis. F.A. Davis Company, Philadelphia, US, pp 5-28).

Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 1986;315:1638-42.

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nature* 1995;377:150-1.

Esparza ML, Sasaki S, Kesteloot H. Nutrition, latitude, and multiple sclerosis mortality: An ecologic study. *Am J Epidemiol* 1995;142:733-737.

Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR et al. "Disability and T2 MRI lesions: a 20 years follow-up of patients with relapse onset of MS. *Brain* 2008; 131:808-17.

Ghadirian P, Jain M, Ducic S, et al. Nutritional factors in the aetiology of multiple sclerosis: A case-control study in Montreal, Canada. *Int J Epidemiol* 1998;27:845-852.

Goodin D. The casual cascade to multiple sclerosis: a model for pathogenesis. *PLoSOne* 2009; 4: e4565.

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K et al. Multiple sclerosis in Iceland: 1. Evidence of a postwar epidemic. *Neurology* 1982; 32:143-50.

Hayes C and Donald Acheson E. A unifying multiple sclerosis aetiology linking virus infection, sunlight, and vitamin D, through viral interleukin-10. *MedHypotheses* 2008; 71: 85-90.

Hayes C. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 2000; 59:531-535.

IEO, 2013: Banca Dati di Composizione degli Alimenti per gli Studi Epidemiologici in Italia

Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972;1:1240-1.

Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI: Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol* 2007;254:471-477.

Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25(6): 491 – 502

Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1975;51:137-57.

Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space - geographic clues to cause. *J Neurovirol* 2000; 6 Suppl 2:S134-40.

Lauer K. The risk of multiple sclerosis in the U.S.A. In relation to socio geographic features: A factor-analytic study. *J Clin Epidemiol* 1994; 47:43-48.

Lincoln JA, Cook SD. An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. *J Neur Sci* 2009;286:54-7.

Loeb C; E. Favale E. "Neurologia". Società editrice universo, 2007

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi S et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-17.

Marrosu MG, Murru MR, Costa G et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 454-7.

Marrosu MG, Murru R, Murru MR et al. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Gen* 2001; 10 (25): 2907-16.

Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Hollis BW. In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>. *J Lab Clin Med* 1989, 114: 301-305.

McCormack PL. Natalizumab: A Review of Its Use in the Management of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Drugs* 2013 73(13):1463-1481

Mikaeloff Y, Caridade G, Tardieu M et al. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 2007;10:2589-95

Montgomery SM, Bahmanyar S, Hillert J et al. Maternal smoking during pregnancy and multiple sclerosis amongst offspring. *Eur J Neurol* 2008;15:1395-9.

Montgomery SM, Bahmanyar S, Hillert J et al. Maternal smoking during pregnancy and multiple sclerosis amongst offspring. *Eur J Neurol* 2008;15:1395-9.

Munger K, Levin R, O'Reilly E et al. Anti-Epstein Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler* 2011; 17: 1185-1193.

O'Connor P, Comi G, Montalban X, et al. Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: two-year results of a phase II extension study. *Neurology* 2009;72:73-9

Olerup and Hillert. HLA class II-associated genetic susceptibility in Multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991;38:1-15.

Osoegawa M, Kira J, Fukazawa T et al. Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *MultScler.* 2009; 2:159-73.

Pierrot-Deseilligny C and Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 2010; 133; 1869-1888.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis : 2010 revisions to the McDonald Criteria, *Ann Neurol* 2011;69(2):292-302

Poser CM. Multiple sclerosis trait: the premorbid stage of Multiple Sclerosis. A hypothesis. *Acta Neurol Scand* 2004;109:239-43.

Pugliatti M, Casetta I, Drulovic J et al. A questionnaire for multinational case-control studies of environmental risk factors in multiple sclerosis (EnvIMS-Q). *ActaNeurolScandSuppl* 2012; (195):43-50.

Pugliatti M, Cossu P, Sotgiu S et al. Clustering of multiple sclerosis, age of onset and gender in Sardinia. *J Neurol Sci* 2009; 286;6-13.

Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA et al. Evidence of early childhood as the susceptibility period in multiple sclerosis: space-time cluster analysis in a Sardinian population. *Am J Epidemiol* 2006; 164:326-33.

Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA et al. Increasing incidence of multiple sclerosis in the province of Sassari, Northern Sardinia. *Neuroepidemiology* 2005; 25: 129-134.

Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2002; 104:182-191.

Pugliatti M, Sotgiu S, Solinas G et al. Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk. *Acta Neurol Scand* 2001; 103:20-26.

Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74 (1):S25-S30

Report of the Scientific Committee for Food, thirty-first series; Nutrient and energy intakes for the European Community, 1992

Riise T, Klauber MR. Relationship between the degree of individual space-time clustering and age at onset of disease among multiple sclerosis patients. *Int J Epidemiol* 1992; Jun;3:528-32.

Rook GAW. Hygiene Hypothesis and Autoimmune Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2012;42:5-15.

Rosati G, Aiello I, Pirastru MI et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Northwestern Sardinia: further evidence for higher frequency in sardinians compared to other italians. *Neuroepidemiology* 1996; 15:10-19.

Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 1996; 347: 1728-30.

Sette S, Le Donne C, Piccinelli R, Arcella D, Turrini A, Leclercq C, On Behalf of the INRAN-SCAI 2005e06 Study Group. The third Italian National Food Consumption Survey, INRAN-SCAI 2005e06 e Part 1: Nutrient intakes in Italy. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011;21:922-32.

Shaygannejad V, Tolou-Ghamari Z. What is the Real Fate of Vitamin D in Multiple Sclerosis? *Int J Prev Med* 2013; May;4(Suppl 2):S159-64.

Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985; 1:1313-5.

Sotgiu S, Pugliatti M, Sotgiu MA et al. Seasonal fluctuation of multiple sclerosis births in Sardinia. *J Neurol* 2006; 253:38-44.

Trojano M, Lucchese G, Graziano G et al. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PLoSOne* 2012; 10: e48078.

Valera P, Zavattari P, Albanese S et al. A correlation study between multiple sclerosis and type 1 diabetes incidences and geochemical data in Europe. *Environ Geochem Health* 2013 Apr 9 [Epub ahead of print].

Webb AR, Holich MF. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Ann Rev Nutr* 1992; 8:375-399.

Wesnes K, Riise T, Bjørnevik K et al. The relationship between body size and the risk of multiple sclerosis. The EnvIMS study. *Mult Scler J* 2012;18:(S4)253.

Wolfson C, Wolfson DB. The latent period of multiple sclerosis: a critical review. *Epidemiology* 1993;4:464-70.

Yamasaki K, Horiuchi I, Minohara M et al. HLA-DPBI\*O5O1-associated opticospinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain* 1999;122:1689-96.

## **RINGRAZIAMENTI**

Fonti di finanziamento

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, grants n. 2007/R/14, and n. 2008/R/19 a M. Pugliatti); Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato dell'Igiene, Sanità e dell'Assistenza Sociale a M. Pugliatti), Italy; Fondazione Banco di Sardegna.

Altro:

Dott.ssa Ilaria Casetta (Dept. of Biomedical and Surgical Sciences, Section of Clinical Neurology, University of Ferrara, Italy)

Dott.ssa Maria Parpinel (Dept. of Medical and Biological Sciences, Unit of Hygiene and Epidemiology, University of Udine, Italy)

Prof. Alberto Ascherio (Department of Nutrition, Department of Epidemiology, Harvard Medical School, Boston, USA)

Prof. Antonio Masala (Department of Surgical, Microsurgical and Medical Sciences, University of Sassari, Italy)

Dott.ssa. Paola Cossu (Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Italy)

Dr. Riccardo DeGennaro (Department of Neurology, University of Ferrara, Italy)

Dott.ssa. Bettina Galanti (Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Italy)

Dott.ssa Angela Gandin (Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Italy)

Dott.ssa. Giannina Arru (Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Italy)