

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/08/2017.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

Renata Brant de Souza Melo

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Orientadora: Profa.Dra Doralina Guimarães Brum Souza

**Botucatu  
2016**

**Renata Brant de Souza Melo**

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestraem Patologia.

Orientadora: Profa.Dra Doralina Guimarães Brum Souza

**Botucatu  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Melo, Renata Brant de Souza.

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla / Renata Brant de Souza Melo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Doralina Guimarães Brum Souza  
Capes: 40101070

1. Esclerose múltipla. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Doenças Desmielinizantes. 4. Genética humana.

Palavras-chave: Desmielinizante; Esclerose múltipla; Genética.

Renata Brant de Souza Melo

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestra em patologia.

Orientador: Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

Comissão examinadora

---

Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

---

Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof. Dr. Fernando Coronetti Gomes da Rocha  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Botucatu, 31 de agosto de 2016.

**Dedico,**

*Aos meus pais, **Virgolino e Conceição**, que continuamente me apoiam e me dão exemplos de retidão e bom caráter.*

*Ao meu esposo, **Roni**, pelo amável companheirismo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus**, por me dar condições de atuar na medicina e ajudar as pessoas;

Aos meus pais, **Virgolino e Conceição**, pela dedicação e integral amor;

Ao meu esposo, **Roni**, pela alegria de estar ao seu lado;

Aos meus amigos, especialmente **Kíria**, por sempre me acolher e à minha família, pela torcida;

À **Dra Doralina** pela confiança, ensinamentos e oportunidade dada ao conhecimento;

Ao **Dr Fernando Coronetti**, por ter me recebido tão gentilmente, no ambulatório de Neuroimunologia da UNESP;

Aos médicos da UNESP pela colaboração na coleta dos dados;

Aos amigos de Botucatu, especialmente **Andréia, Paula, Thálitta, Iane e Luana** pelas alegrias e força;

Aos funcionários da UNESP, especialmente à **Vânia Soler**, pela viabilização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho (processo n° 2012/508391);

Aos meus amigos da Santa Casa de Belo Horizonte, especialmente ao **Dr Antonio Pereira**, pelo incentivo à busca do aprendizado e compreensão das minhas ausências;

E, finalmente, aos pacientes, que de forma generosa me permitiram aprender a cada dia.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas  
Lista de Figuras  
Lista de Símbolos  
Lista de Abreviaturas e Siglas  
RESUMO  
*ABSTRACT*

<i>Capítulo I</i> .....	15
1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Genes marcadores informativos de ancestralidade.....	22
2.OBJETIVOS.....	29
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.RESULTADOS.....	32
5.DISSCUSSÃO.....	44
6.CONCLUSÃO.....	48
ANEXOS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
<i>Capítulo II</i> .....	66
1.INTRODUCTION.....	68
2.OBJECTIVE.....	69
3.MATERIALS AND METHODS.....	70
4.RESULTS.....	70
5.DISCUSSION.....	71
6.CONCLUSION.....	73
REFERENCES.....	73



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Frequência alélica dos marcadores informativos de ancestralidade nas populações africanas, europeias e ameríndias.

Tabela 2. Características gerais dos genes marcadores de ancestralidade.

Tabela 3. Estado de validação e alelo ancestral dos genes marcadores informativos de ancestralidade

Tabela 4. Aspectos gerais sobre os genes marcadores de ancestralidade

Tabela 5. Aspectos clínicos e demográficos de pacientes com esclerose múltipla da região noroeste do Estado de São Paulo

Tabela 6. Análise entre marcadores de ancestralidade e chance de diagnóstico de esclerose múltipla e controles.

Tabela 7. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início da esclerose múltipla

Tabela 8. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início, por faixa etária, na esclerose múltipla.

Tabela 8a. Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS

Tabela 8a (continuação). Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS

Tabela 9. Análise de associação entre idade de início, por estatificação, e marcadores de ancestralidade na esclerose múltipla

Tabela 10. Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

Tabela 11. Frequência genotípica de marcadores de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pelo EDSS

Tabela 12. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor ou igual a 2,5 e maior do que 2,5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla.

Tabela 13. Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação a gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

Tabela 14. Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS.

Tabela 14a. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

Tabela 14a (continuação). Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

Tabela 15. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor do que 5 e maior ou igual a 5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genes envolvidos na via de diferenciação do linfócito Thelper, nas doenças inflamatórias desmielinizantes.

Figura 2. Prevalência mundial da esclerose múltipla (2013)

Figura 3. Frequências alélicas de 12 *ancestry informative markers* (AIMs) em europeus, africanos e ameríndios e a frequência alélica diferencial entre essas populações ancestrais.

Figura 4. Validação dos 12 AIMs componentes do painel na distinção das populações ancestrais europeia, africana e ameríndias por haplótipos cedidos por Mark Shriver

Figura 5. Estimativa de ancestralidade individual e por grupo de pacientes com EM e controles

Figura 6. Mapa da distribuição mundial dos alelos do gene *FY*.

Figura 7. Modo de ação da apoA-I

## LISTA DE SÍMBOLOS

- > Maior
- $\geq$  Maior e igual
- < Menor
- $\leq$  Menor e igual
- % Porcento
- $\delta$  Sigma

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AFR	Africana
AIMs	<i>Ancestry informative markers</i>
AMER	Ameríndia
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
ApoB	Apolipoproteína B
C	Citosina
CT	Colesterol total
D ou del	Deleção
DA	Dopamina
DARC	<i>Duffy antigen/chemokine receptor</i>
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EDSS	<i>Expanded disability status scale</i>
EUR	Europeia
EM	Esclerose Múltipla
G	Guanina
HDL	<i>Highdensity lipoprotein</i>
I ou ins	Inserção
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
LPL	Lipoproteína lipase
N	Número da amostra
OR	<i>Odds Ratio</i>
P	Valor de p
PAGE	PolyAcrylamide gel electrophoresis
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>Restriction fragmente length polymorphism</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T	Timina
TNF- $\alpha$	<i>Necrosis fator tumoral-alfa</i>

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória autoimune mais comum do sistema nervoso central que acomete adultos jovens. É mais frequente no sexo feminino e em população caucasiana. Apresenta pior prognóstico nos homens, nos negros e naqueles com idade de início superior a 40 anos. Na maioria dos casos, manifesta-se na forma de surto-remissão, em que o paciente apresenta piora clínico-neurológica e melhora espontânea e parcial do quadro. Na recorrência dos surtos, há um acúmulo de déficits, ao longo do tempo e estas incapacidades que podem ser registradas através da escala do *EDSS* (derivado do inglês *Expanded Disability Status Scale*), cujos valores compreendem entre 0 a 10, sendo 0 a melhor condição do paciente e 10, o óbito. A etiologia permanece desconhecida, mas há evidências que fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento da doença. A população brasileira apresenta diferentes graus de miscigenação, resultante de intercruzamento da população europeia, africana e ameríndia, de acordo com as regiões do país. Tendo em vista esta peculiaridade e o fato de a EM ser mais grave nos afro-descendentes, bem como apresentar menor prevalência em população miscigenada, torna-se interessante o estudo do risco étnico e genético desta doença no Brasil. Em estudo prévio pelo mesmo grupo, a contribuição genética da população europeia, africana e ameríndia em pacientes com EM foi estimada utilizando um painel de 12 genes marcadores informativos de ancestralidade (derivado do inglês *ancestry informative markers\_AIMs*). Os principais genes utilizados para estimar a contribuição europeia foram *FY*, *SB19.3* e *APOA1*. Já para a contribuição ameríndia foram *PV92* e *CKM*. E, por último, para a africana, *AT3*, *LPL* e *MID575*. Os achados prévios evidenciaram que a contribuição europeia predomina na EM, seguida da africana e ameríndia. Similar ao que ocorre na população geral da região Sudeste do Brasil. Neste estudo, os AIMs foram analisados quanto a frequência dos seus alelos em relação as variáveis clínicas da EM, em amostra de pacientes da região Sudeste do Brasil, já que alguns destes genes tem papel na inflamação.

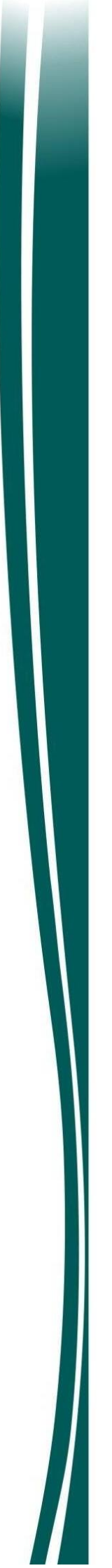
Palavras-chave: Esclerose múltipla, genética, desmielinizante.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common autoimmune inflammatory disease of the central nervous system that affects young people. It is common in females and in Caucasians, with a ratio of worse prognosis in men, blacks and age of onset more than 40 years. In most patients manifests itself in the form of relapsing-remitting in which the patient presents worsening clinical and neurological and spontaneous and partial improvement of symptoms. In most recurrence of symptoms, there is an accumulation of deficits over time and these impairments are recorded by the EDSS(Expanded Disability Status Scale), whose values comprise between 0 to 10, with 0 the better the patient's condition and 10, death. There is interaction between environmental and genetic factors, but the etiology remains unknown. The Brazilian population is five centuries of crossbreeding between populations. European, African and Amerindian and may have different degrees of miscegenation, according to the regions. In view of this peculiarity and the fact that MS is more severe in Afro-descendants, it is interesting the study of ethno-genetic risk of this disease in Brazil. And for that, the ancestry informative markers (AIMs) will be used as a robust tool in the study of case-control in order to avoid spurious association. They are markers of specific population- and has different frequencies in different populations. To estimate the genetic contribution of each population, in the Brazilian population, one AIMs panel of 12 genes was analyzed. The main genes used to estimate the European contribution will *FY*, *SB19.3* and *APOA1*. As for the Amerindian be *PV92* and *CKM*. And lastly, for the African, *AT3*, *LPL* and *MID575*. These markers will be analyzed in terms of the biological role, and not for your paper ancestry marker alone. Given this context, we will study the frequency of AIMs individually and check if the frequency of its alleles have any association with the clinical characteristics of MS, as some of these genes have immune function.

Keywords: Multiple sclerosis. ancestry informative markers. demyelinating.

## Capítulo I





## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a principal doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), com idade de início entre 20 e 40 anos, acometendo, predominantemente, mulheres caucasianas<sup>1,2</sup>. A doença possui pior prognóstico nos negros, nos homens e nos pacientes que apresentam idade de início superior aos 40 anos de idade<sup>3</sup>.

A EM manifesta-se predominantemente na forma de surto-remissão, condição que o paciente apresenta sintomas neurológicos focais de instalação subaguda, seguido de período de estabilização e resolução dos sintomas, espontaneamente ou após tratamento<sup>4</sup>. O período entre dois episódios de manifestações neurológicas (surto) é denominado remissão. Face à recorrência dos surtos, há um acúmulo de déficits neurológicos, ao longo do tempo<sup>5</sup>. Essas incapacidades são registradas por meio da escala de incapacidade EDSS (derivado do inglês *Expanded Disability Status Scale*), que compreende valores de 0 a 10, sendo 0 a melhor condição do paciente e 10, o óbito<sup>6</sup>. Pacientes afrodescendentes alcançam escores de incapacidade funcional mais precoce que os caucasianos e a gravidade inicial dos surtos é leve<sup>7,8</sup>.

A etiologia da EM não é conhecida. Estudo populacional de EM com gêmeos evidenciou 25% concordância entre gêmeos monozigóticos, 2,3% entre gêmeos dizigóticos e 1,9% entre consanguíneos não gêmeos<sup>9</sup> o que reforça a contribuição de fatores genéticos. Adicionalmente, fatores ambientais como infecções virais e deficiência de vitamina D também são fortes candidatos<sup>10</sup>. Considera-se que fatores ambientais e genéticos interagem e contribuem para desenvolvimento da doença<sup>11</sup>. Comorbidades como dislipidemias contribuem para a progressão da EM<sup>12</sup>.

Há mais de 40 anos, vêm sendo acumuladas informações de marcadores genéticos associados à EM. Grupos de alelos *HLA-DRB1* têm sido primariamente associados, embora publicações implicando os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DQ* sejam relatadas<sup>13</sup>. O grupo de alelos *HLA-DRB1\*15* é o principal fator de risco para EM nos brasileiros, norte-americanos, europeus e asiáticos<sup>13-16</sup>. A presença do grupo de alelo *HLA-DRB1\*11* ou a ausência do *HLA-A\*02:01* são considerados fatores de proteção ou resistência ao desenvolvimento de EM. Atualmente, com o refinamento da técnica genômica

utilizando pesquisa de marcadores genéticos em grande escala, com grande amostra populacional, mais de uma centena de genes já foram associados com EM, sendo muitos desses genes relacionados com o controle da resposta imune (Figura 1)<sup>17</sup>.

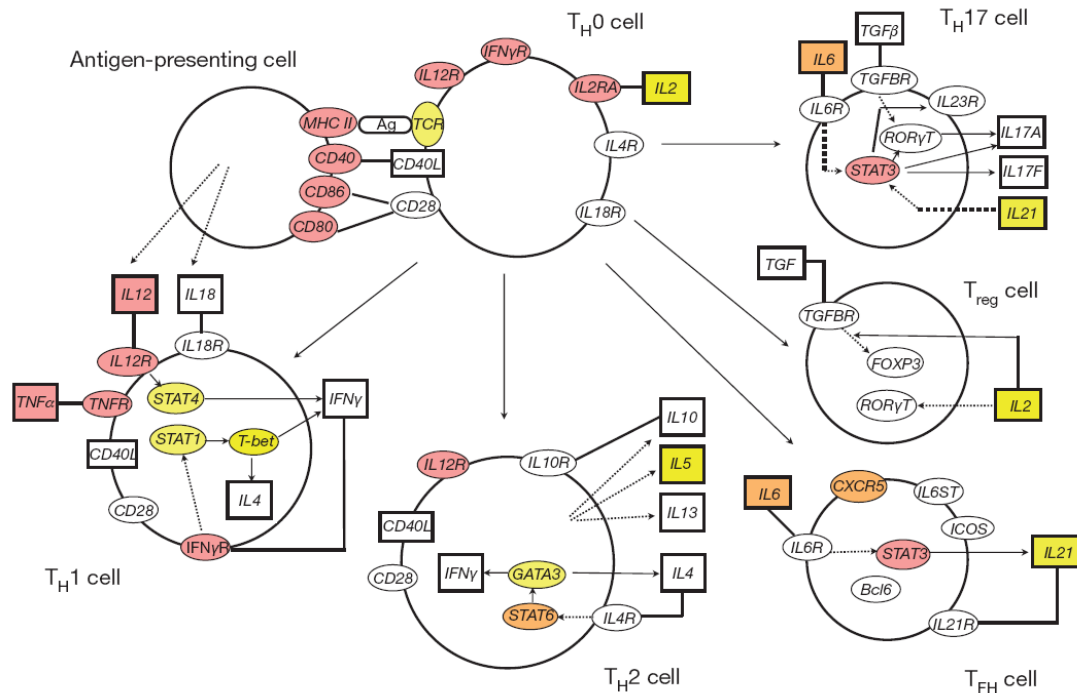


Figura 1. Genes envolvidos na via de diferenciação do linfócito Thelper, nas doenças inflamatórias desmielinizantes.

A EM manifesta-se em diferentes grupos populacionais e em todos os continentes, porém com diferentes taxas de prevalência e risco (Figura 2)<sup>18</sup>. Na cidade de São Paulo (Sudeste do Brasil), a prevalência da EM foi estimada em 15/100.000<sup>19</sup> e no Recife (Nordeste do Brasil) foi estimada em 1,3/100.000 habitantes<sup>20</sup>. Nos países europeus com fluxos migratórios para o Brasil, como a Itália e a Espanha, a prevalência de EM é maior do que a observada em algumas regiões brasileiras<sup>21,22</sup>.

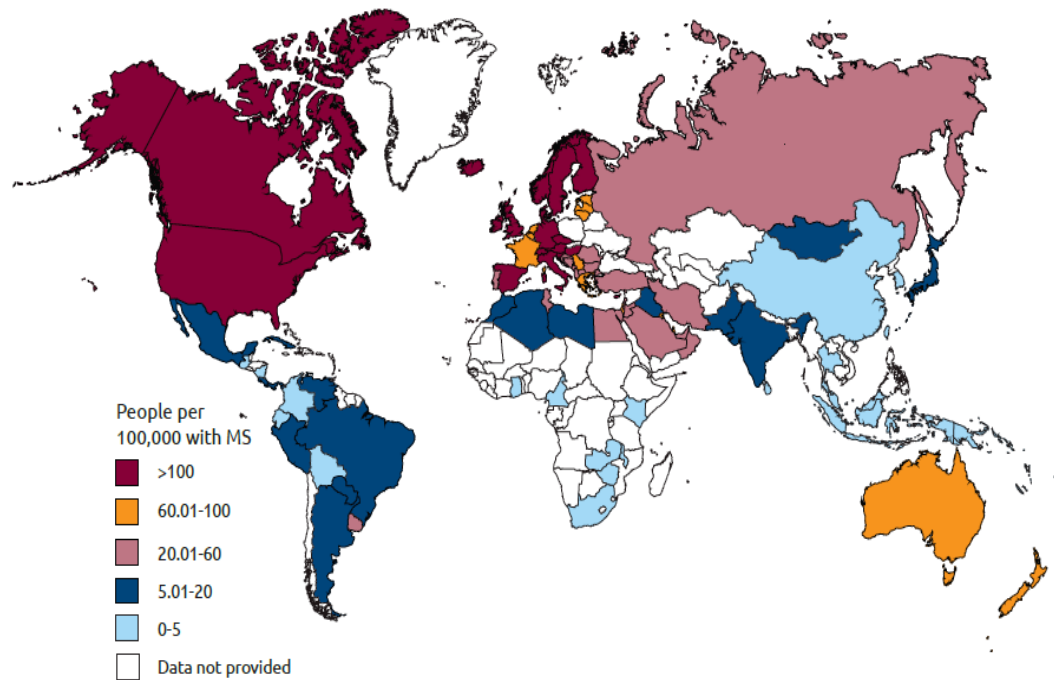


Figura 2. Prevalência mundial da esclerose múltipla por país (2013)<sup>18</sup>.

O Brasil tem fatores étnicos e genéticos diferentes daqueles observados onde a maioria dos estudos genéticos tem sido conduzidos, principalmente Europa e América do Norte. De acordo com o censo nacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 42,6% dos brasileiros se autoidentificam com ancestralidade mista<sup>23</sup>. A população brasileira representa cinco séculos de intercruzamento étnico de indivíduos procedentes dos três continentes, incluindo africanos, caucasianos e nativos americanos. Essa diversidade genética é singular e cria um terreno único que pode influenciar a epidemiologia, a gravidade dos surtos, a idade de início e a resposta ao tratamento na EM.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo<sup>24</sup>, a contribuição genética da população europeia, africana e ameríndia em pacientes com EM foi estimada utilizando um painel de 12 genes marcadores informativos de ancestralidade, AIM derivado do inglês *Ancestry informative markers* (Tabela 1\_Anexos). Nesse, os principais genes utilizados foram: i) para estimar a contribuição europeia *FY-null*, *SB19.3* e *APOA1*; ii) contribuição ameríndia, os genes *PV92* e *CKM*, e iii) contribuição africana, os genes *AT3*, *LPL* e *MID575*<sup>24</sup>. Na Figura 3, apresentamos a frequência alélica de cada AIMs nas populações

africanas, europeias e ameríndias<sup>24</sup>.

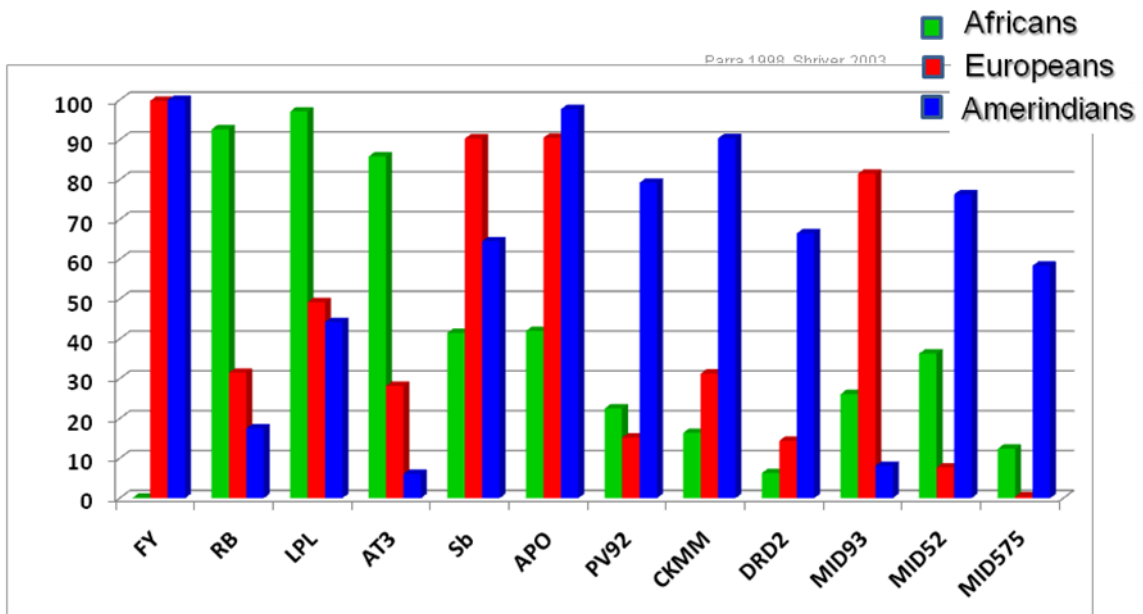


Figura 3. Frequências alélicas de 12 *ancestry informative markers* (AIMs) em europeus, africanos e ameríndios e a frequência alélica diferencial entre essas populações ancestrais

*Considerando que três grupos foram obtidos sem qualquer superposição, o painel de 12 AIMs foi suficiente para adequada discriminação entre as populações parentais: cada uma das populações se agrupou em um dos vértices do triângulo. Os haplótipos de europeus, africanos e ameríndios foram cedidos pelo Dr. Mark Shriver<sup>28</sup>.*

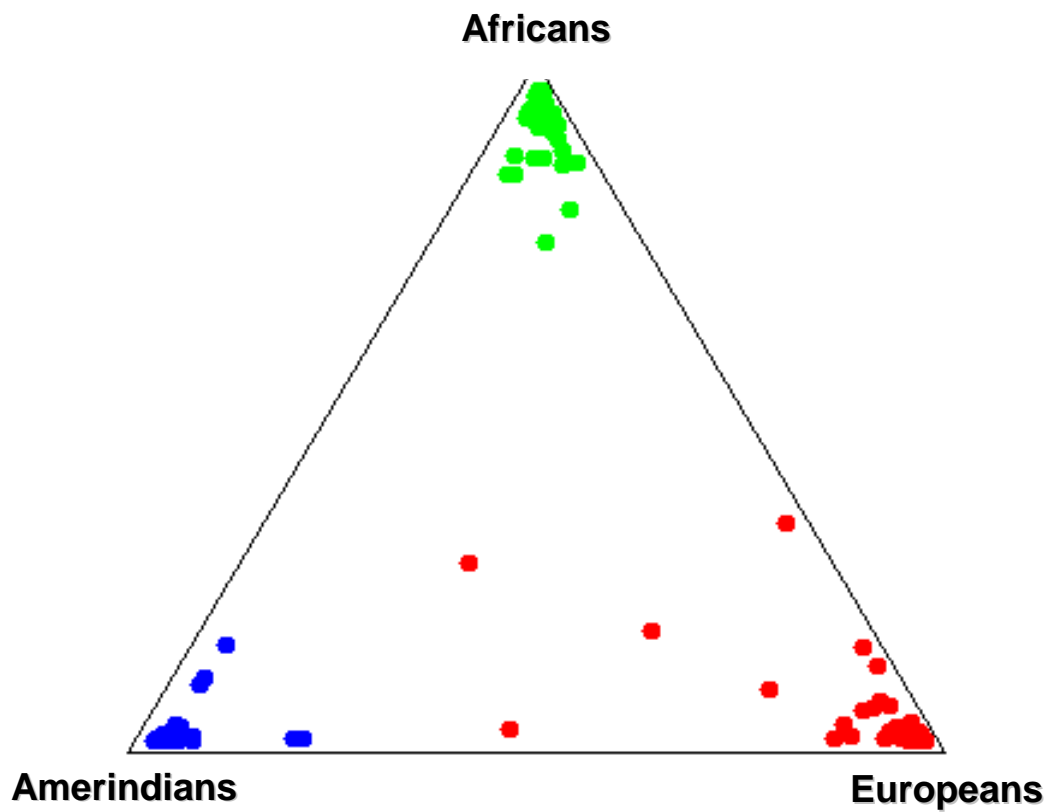
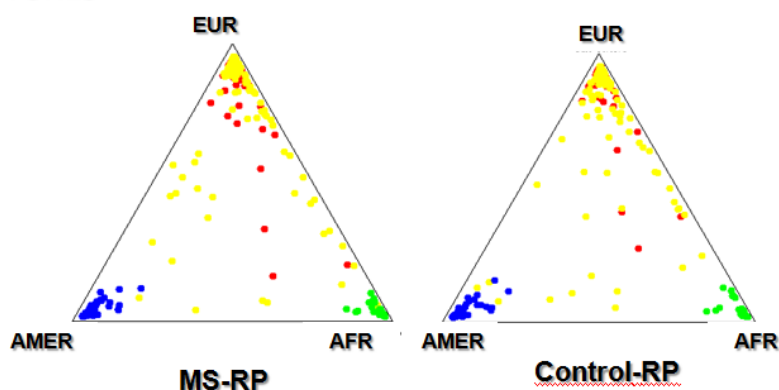


Figura 4. Validação dos 12 AIMs componentes do painel na distinção das populações ancestrais europeia, africana e ameríndias por haplótipos cedidos por Mark Shriver.

***Estimativa de ancestralidade individual pelo software STRUCTURES***



***Estimativa de ancestralidade nos grupos de pacientes com EM e controles***

	MS-RP	Control-RP
Europeus	0.785 ± 0.002	0.704 ± 0.012
Africanos	0.125 ± 0.001	0.179 ± 0.007
Ameríndios	0.090 ± 0.001	0.117 ± 0.009
	R2 = 0.999986	R2 = 0.999238

10

Figura 5. Estimativa de ancestralidade individual e por grupo de pacientes com EM e controles.

Os achados desse estudo evidenciaram que a contribuição europeia predomina na EM, seguida da africana e ameríndia, similar ao que ocorre na população da região Sudeste do Brasil. Em populações estruturadas como a brasileira, os genes *AIMs* são importantes para evitar associações espúrias nos estudos genéticos do tipo caso-controle<sup>29</sup>. Uma aplicação potencial desses genes nas doenças com risco étnico-genético, como ocorre na EM, é verificar a associação com a chance de desenvolver a doença e de contribuir com as variáveis clínicas e laboratoriais. A seguir, apresentamos características dos *AIMs* que foram analisados.

## **6.CONCLUSÃO**

Marcadores genéticos com perfil população alelo específico pode influenciarna taxa de manifestação da EM e aspectos clínicos da doença, explicando algumas peculiaridades da doença em diferentes populações. O genótipo *APOA1* ins/ins (rs3138522) parece estar associado à menor gravidade do primeiro surto dos pacientes com EM, emcontrapartida o *FY-null A/G* (rs2814778) está associado a menor risco de desenvolvimento da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol*. 2006;19(3):248-254.
2. Papais-Alvarenga RM, Vasconcelos CC, Carra A, et al. Central Nervous System Idiopathic Inflammatory Demyelinating Disorders in South Americans: A Descriptive, Multicenter, Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0127757.
3. Tintore M, Rovira À, Río J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1863-1874.
4. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1430-1438.
5. Damasceno A, Von Glehn F, Brandão CO, Damasceno BP, Cendes F. Prognostic indicators for long-term disability in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2013;324(1-2):29-33.
6. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452.
7. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1914-1929.
8. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. *Brain*. 2000;123 Pt 3:641-649.
9. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1638-1642.
10. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*. 2016;36(2):103-114.
11. Hedström AK, Alfredsson L, Olsson T. Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(3):293-298.
12. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2011;8:127.
13. Oksenberg JR BL, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet* 2004;1:160-167.
14. Kira J KT, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol*. 1996;40:569-574.
15. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1\*15 allele group and the DRB1\*1501 and DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2):118-124.
16. Alves-Leon SV P-AR, Magalhães M, Alvarenga M, Thuler LC, Fernández y Fernandez O. Ethnicity- dependent association of HLA DRB1-DQA1- DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2007;115:306-311.
17. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-219.
18. Atlas of MS. 2013; Prevalence by country. Available at: [www.atlasofms.org](http://www.atlasofms.org).
19. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand*. 2001;104(4):208-213.



20. Ferreira ML, Machado MI, Vilela ML, et al. [Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(4):1027-1032.
21. Granieri E, Tola R, Paolino E, Rosati G, Carreras M, Monetti VC. The frequency of multiple sclerosis in Italy: a descriptive study in Ferrara. *Ann Neurol*. 1985;17(1):80-84.
22. Rosati G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl 2:S164-174.
23. IBGE. Síntese dos indicadores- 2006. IBGE- Instituto de Geografia e Estatística: IBGE\_Rio de Janeiro; 2006.
24. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS One*. 2013;8(3):e58925.
25. Parra EJ, Marcini A, Akey J, et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet*. 1998;63(6):1839-1851.
26. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet*. 2003;112(4):387-399.
27. Luizon MR, Mendes-Junior CT, De Oliveira SF, Simões AL. Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. *Am J Hum Biol*. 2008;20(1):86-90.
28. Shriver MD, Smith MW, Jin L, et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*. 1997;60(4):957-964.
29. Price AL, Patterson N, Yu F, et al. A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet*. 2007;80(6):1024-1036.
30. Bachelierie F B-BA, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology.[corrected].LXXXIX.Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Vol 662013.
31. Terence J. Hadley Z-hL, Kazimiera Wasniowska,Alvin W Martin,Stephen C Peiper,Joseph Hesseigesser,Richard Horuk. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest*. 1994;94:985–991.
32. Stephen C. Peiper Z-xW, Kuldeep Neote,, Alvin W. Martin HJS, Maryrose J. Conklyn,, Kevin Ogborne TJH, Zhao-hai Lu,, Joseph Hesselgesser RH. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med*. 1995;181:1311–1317.
33. Pogo AO, Chaudhuri A. Duffy and receptors for *P. vivax* and chemotactic peptides. *Transfus Clin Biol*. 1995;2(4):269-276.
34. Horuk R CC, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite plasmodium vivax: The erythrocyte chemokine receptor *Science*. 1993;261:1182-1184.
35. Horuk R MA, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ, Peiper SC. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol*. 1997;158:2882-2890.
36. Langhi DM Jr BJ. Duffy blood group and malaria. *Hematolgy*. 2006;11:389-398.
37. Tournamille C CY, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the *Duffy* gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature Genetics*. 1995;10:224 - 228.
38. Asok Chaudhuri JP, Valerie Zbrzezna, Kenneth Williams, Subhash Gulati, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood

- group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. PNASProc. Natl. Acad. Sci.1993.
39. Pogo AO CA. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol.* 2000;37:122-129.
  40. Minten C, Alt C, Gentner M, et al. DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation. *Brain.* 2014;137(Pt 5):1454-1469.
  41. Reich D NM, Kao WH, Akyzbekova EL, Tandon A, Patterson N, Mullikin J, Hsueh WC, Cheng CY, Coresh J, Boerwinkle E, Li M, Waliszewska A, Neubauer J, Li R, Leak TS, Ekunwe L, Files JC, Hardy CL, Zmuda JM, Taylor HA, Ziv E, Harris TB, Wilson JG. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet.* 2009;5.
  42. Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun.* 2011;2:266.
  43. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* 2011;105(4):635-646.
  44. Borg JY, Owen MC, Soria C, Soria J, Caen J, Carrell RW. Proposed heparin binding site in antithrombin based on arginine 47. A new variant Rouen-II, 47 Arg to Ser. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1292-1296.
  45. Okajima K, Abe H, Maeda S, et al. Antithrombin III Nagasaki (Ser116-Pro): a heterozygous variant with defective heparin binding associated with thrombosis. *Blood.* 1993;81(5):1300-1305.
  46. Baud O, Picard V, Durand P, et al. Intracerebral hemorrhage associated with a novel antithrombin gene mutation in a neonate. *J Pediatr.* 2001;139(5):741-743.
  47. Kobayashi J, Mabuchi H. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Ann Clin Biochem.* 2015;52(Pt 6):632-637.
  48. Xu X, Wang X, Todd EM, et al. Mst1 Kinase Regulates the Actin-Bundling Protein L-Plastin To Promote T Cell Migration. *J Immunol.* 2016;197(5):1683-1691.
  49. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008;40(2):161-169.
  50. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2008;358(12):1240-1249.
  51. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009;41(1):47-55.
  52. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-713.
  53. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013;45(11):1274-1283.
  54. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-753.
  55. Wilson DE, Emi M, Iverius PH, et al. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest.* 1990;86(3):735-750.
  56. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J Clin Invest.* 1997;99(7):1606-1613.
  57. Clee SM, Bissada N, Miao F, et al. Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2000;41(4):521-531.
  58. Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr.* 2005;24(1):16-31.

59. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*. 2001;97(8):2381-2389.
60. Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev*. 2002;1(1-2):111-117.
61. Lettre G, Palmer CD, Young T, et al. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project. *PLoS Genet*. 2011;7(2):e1001300.
62. Rusciano G, Pesce G, Zito G, et al. Insights into the interaction of the N-terminal amyloidogenic polypeptide of ApoA-I with model cellular membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(4):795-801.
63. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun*. 2010;24(4):525-528.
64. Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12912-12916.
65. Dijkstra CD, van der Voort ER, De Groot CJ, et al. Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinology*. 1994;19(2):135-142.
66. Bałkowiec-Iskra E, Kurkowska-Jastrzebska I, Joniec I, et al. MPTP-induced central dopamine depletion exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL mice. *Inflamm Res*. 2007;56(8):311-317.
67. O'Sullivan D, Green L, Stone S, et al. Treatment with the antipsychotic agent, risperidone, reduces disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014;9(8):e104430.
68. Lieberknecht V, Junqueira SC, Cunha MP, et al. Pramipexole, a Dopamine D2/D3 Receptor-Preferring Agonist, Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development in Mice. *Mol Neurobiol*. 2016.
69. Popovic M, Stanojevic Z, Tosic J, et al. Neuroprotective arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neurochem*. 2015;135(1):125-138.
70. Comings DE, Comings BG, Muhleman D, et al. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA*. 1991;266(13):1793-1800.
71. Vink M, de Leeuw M, Luykx JJ, et al. DRD2 Schizophrenia-Risk Allele Is Associated With Impaired Striatal Functioning in Unaffected Siblings of Schizophrenia Patients. *Schizophr Bull*. 2015.
72. Klein C, Brin MF, Kramer P, et al. Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):5173-5176.
73. Zai CC, Ehtesham S, Choi E, et al. Dopaminergic system genes in childhood aggression: possible role for DRD2. *World J Biol Psychiatry*. 2012;13(1):65-74.
74. Müller DJ, Zai CC, Sicard M, et al. Systematic analysis of dopamine receptor genes (DRD1-DRD5) in antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(2):156-164.
75. Rowland BD, Bernards R. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*. 2006;127(5):871-874.
76. Santos M, Martínez-Fernández M, Dueñas M, et al. In vivo disruption of an Rb-E2F-Ezh2 signaling loop causes bladder cancer. *Cancer Res*. 2014;74(22):6565-6577.
77. Scott MC, Sarver AL, Tomiyasu H, et al. Aberrant Retinoblastoma (RB)-E2F Transcriptional Regulation Defines Molecular Phenotypes of Osteosarcoma. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28070-28083.

78. Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, et al. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Engl J Med.* 1989;321(25):1689-1695.
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127.
80. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M. Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol Biol.* 2009;578:405-414.
81. Cree BA, Khan O, Bourdette D, et al. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;63(11):2039-2045.
82. Ferreira Vasconcelos CC, Cruz Dos Santos GA, Thuler LC, Camargo SM, Papais Alvarenga RM. African ancestry is a predictor factor to secondary progression in clinical course of multiple sclerosis. *ISRN Neurol.* 2012;2012:410629.
83. Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol.* 2007;6(10):887-902.
84. Tremlett H, Devonshire V. Is late-onset multiple sclerosis associated with a worse outcome? *Neurology.* 2006;67(6):954-959.
85. Roohani P, Emiru T, Carpenter A, et al. Late onset multiple sclerosis: Is it really late onset? *Mult Scler Relat Disord.* 2014;3(4):444-449.
86. Foster E, Tsang BK, Skibina O, Kam A, Storey E. Case report of multiple sclerosis diagnosis in an 82-year old male. *Mult Scler Relat Disord.* 2014;3(3):413-415.
87. Renoux C, Vukusic S, Confavreux C. The natural history of multiple sclerosis with childhood onset. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008;110(9):897-904.
88. Kis B, Rumberg B, Berlit P. Clinical characteristics of patients with late-onset multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255(5):697-702.
89. Swanton J, Fernando K, Miller D. Early prognosis of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:371-391.
90. Confavreux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain.* 1980;103(2):281-300.
91. Held U, Heigenhauser L, Shang C, Kappos L, Polman C, Research SLCfM. Predictors of relapse rate in MS clinical trials. *Neurology.* 2005;65(11):1769-1773.
92. Bentley AR, Chen G, Shriner D, et al. Gene-based sequencing identifies lipid-influencing variants with ethnicity-specific effects in African Americans. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004190.
93. Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000;102(2):113-124.
94. Esquifino AI, Cano P, Zapata A, Cardinali DP. Experimental allergic encephalomyelitis in pituitary-grafted Lewis rats. *J Neuroinflammation.* 2006;3:20.
95. Charan A, Shewade DG, Rajkumar RP, Chandrasekaran A. Relation between serum prolactin levels and antipsychotic response to risperidone in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2016;240:209-213.
96. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976;295(6):302-304.
97. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1184-1191.
98. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood.* 1996;87(1):378-385.

99. Reich D, Nalls MA, Kao WH, et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet.* 2009;5(1):e1000360.
100. Browne P, Chandraratna D, Angood C, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83(11):1022-1024.
101. Finkelsztejn A, Lopes JS, Noal J, Finkelsztejn JM. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(2):104-106.
102. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011;6(2):e17063.
103. Naismith RT, Trinkaus K, Cross AH. Phenotype and prognosis in African-Americans with multiple sclerosis: a retrospective chart review. *Mult Scler.* 2006;12(6):775-781.