

Un nuovo ruolo del *CYP2R1* nella sclerosi multipla

Luisa Agnello¹, Concetta Scazzone¹, Paolo Ragonese², Giulia Bivona¹, Bruna Lo Sasso¹, Salvatore Milano³, Giuseppe Salemi², Chiara Bellia¹, Marcello Ciaccio^{1,3}

¹Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo

²Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche, Università degli Studi di Palermo

³Unità Operativa Complessa di Medicina di Laboratorio-CoreLab, Policlinico "P. Giaccone", Palermo

ABSTRACT

A new role of *CYP2R1* in multiple sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative autoimmune disease resulting from a complex interaction of genetic and environmental factors. Among these, vitamin D and genetic variants associated with vitamin D metabolism have gained great attention. The aim of our study was to assess two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CYP2R1* in relation to serum 25-OH-vitamin D₃ levels in MS patients and healthy controls. 25-OH-vitamin D₃ serum concentrations and genotyping of *CYP2R1*-SNPs gene were analysed both in MS patients and in healthy controls. In particular, rs10741657 and rs10766197 of *CYP2R1* gene were assessed by real-time allelic discrimination Taq-Man assay (Applied Biosystems, Forster City, USA); 25-OH-vitamin D₃ serum concentration was measured by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method. Statistical analysis was performed by a SPSS software (version 13.0). The analysis of the obtained results showed lower 25-OH-vitamin D₃ concentrations in MS patients than in controls. When comparing genotype distribution and allele frequencies of the two selected SNPs between cases and controls, significant differences were observed only for *CYP2R1* rs10766197. Minor allele of *CYP2R1* rs10766197 (A) was significantly represented in MS patients, demonstrating an association of allele A to MS. Analysis of the *CYP2R1* rs10766197 distribution in MS patients showed that patients carrying the genotype AA had a trend of lower levels of 25-OH-vitamin D₃ in comparison to those with genotype GG or GA, although not statistically significant. Moreover, after stratifying MS patients according to gender, we found that the minor allele A of rs10766197 in homozygosis was associated with disease progression, assessed by Expanded Disability Status Scale and Multiple Sclerosis Severity Score scores, only in men. Our study demonstrates a role of *CYP2R1* in both risk and progression of MS, with sex-related differences.

INTRODUZIONE

La vitamina D è un ormone steroideo liposolubile con un ruolo critico nell'omeostasi fosfocalcica, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare, e nell'immunomodulazione. Una sua carenza è associata a un maggiore rischio di sviluppare patologie ossee, quali il rachitismo, l'osteomalacia e l'osteoporosi; inoltre, negli ultimi anni è emerso che l'ipovitaminosi D è associata a disturbi non scheletrici, quali malattie cardiovascolari, autoimmuni ed alcune neoplasie. Nell'ambito delle malattie autoimmuni, è stato descritto in letteratura, fin dal 1974, un ruolo protettivo della vitamina D sul rischio di sviluppare sclerosi multipla (SM) (1).

La SM è una malattia neurodegenerativa cronica del

sistema nervoso centrale (SNC) in cui una complessa interazione tra infiammazione, demielinizzazione e danno neuro-assonale porta alla disabilità clinica. I pazienti presentano un decorso variabile della malattia la cui progressione può essere valutata mediante varie scale cliniche, tra cui le più comunemente utilizzate sono la "Expanded Disability Status Scale" (EDSS) e la "Multiple Sclerosis Severity Score" (MSSS).

Generalmente, i pazienti con SM presentano basse concentrazioni sieriche di vitamina D. Inoltre, studi *in vivo* su modelli murini di encefalomielite autoimmune, che rappresenta il miglior modello sperimentale di SM, e analisi *in vitro* su pazienti con SM hanno rilevato un effetto immunomodulatore della vitamina D (2,3). Infine, da studi murini è emerso un ruolo della vitamina D nel processo di de/re-mielinizzazione (4). Queste evidenze

Corrispondenza a: Luisa Agnello, Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo, e-mail: luisa.agnello@gmail.com

Ricevuto: 08.03.2018

Revisionato: 28.05.2018

Accettato: 01.06.2018

Pubblicato on-line: 11.10.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.060

biochimica clinica, 2018

supportano un possibile effetto patogenetico dell'ipovitaminosi D nel rischio di sviluppare SM. Infatti, in presenza di ridotte concentrazioni di vitamina D, vengono meno sia il ruolo neuroprotettivo che di regolazione della risposta immunitaria, favorendo così l'insorgenza della malattia.

Nell'uomo, la vitamina D è principalmente sintetizzata nella cute in seguito a esposizione alle radiazioni solari ultraviolette (UV) e solo il 10% deriva dalla dieta perché comunemente gli alimenti naturali contengono solo tracce di vitamina D (5); la vitamina D può, tuttavia, essere assunta tramite integratori, compresse multivitaminiche o prodotti alimentari fortificati.

È nota in letteratura una variabilità interindividuale nello status di vitamina D, di cui circa il 25% può essere spiegato da fattori, quali l'esposizione alla luce solare e l'assunzione di vitamina D, ma il contributo più significativo (23-80%) sembrerebbe derivare da fattori genetici, come suggerito da studi su gemelli e familiari (6, 7). Nell'ultimo decennio, "Genome Wide Association Studies" (GWAS) e un numero crescente di studi su geni candidati hanno rivelato un'associazione tra varianti nei geni che codificano per fattori coinvolti nella sintesi, nel metabolismo e nel trasporto della vitamina D e l'ipovitaminosi D.

Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente valutato l'influenza di varianti nei geni che codificano per il recettore della vitamina D (VDR), il "group-specific component" (GC) e il citocromo P450 27B1 (CYP27B1) sui livelli di vitamina D in pazienti con SM (8, 9). Recentemente, due GWAS condotti su soggetti di origine europea hanno identificato, indipendentemente, varianti nel gene *CYP2R1* associate a più bassi livelli di vitamina D (10, 11).

Il *CYP2R1* appartiene alla famiglia del citocromo P450 ed è uno dei principali enzimi a monte della via metabolica della vitamina D. Sebbene sia noto che i citocromi hanno un ruolo importante nei processi di ossidazione/riduzione, partecipando all'eliminazione dei composti tossici a livello epatico (12), oggi è ampiamente documentato che sono coinvolti anche nel metabolismo della vitamina D. In particolare, il *CYP2R1* è un enzima che catalizza l'idrossilazione epatica della vitamina D₃ in posizione 25-C per formare la 25-OH-vitamina D₃ (25-OH-D₃), nota come calcidiolo, che rappresenta la forma più abbondante di vitamina D circolante, in quanto riflette sia il contributo cutaneo che alimentare, ed è considerato un affidabile indicatore dello status di vitamina D.

Scopo del nostro studio è valutare l'associazione tra polimorfismi del gene che codifica per l'enzima *CYP2R1* (rs10766197 e rs10741657), le concentrazioni plasmatiche di 25-OH-D₃ e SM, in pazienti affetti dalla malattia e in una popolazione controllo.

MATERIALI E METODI

Pazienti e controlli

Questo studio caso-controllo retrospettivo ha incluso

un totale di 265 soggetti provenienti dalla Sicilia occidentale, di cui 105 pazienti con SM (casi) e 160 soggetti sani (controlli). I casi sono stati reclutati da giugno a dicembre 2014, presso il dipartimento di Neurologia, Policlinico P. Giaccone, Università degli Studi di Palermo. I controlli sono rappresentati da donatori di sangue selezionati per età, sesso ed etnia, reclutati da aprile 2015 a luglio 2016, presso l'unità di Medicina Trasfusionale dell'Ospedale Villa Sofia-Cervello di Palermo. Il comitato etico locale ha approvato il protocollo e tutti i soggetti hanno partecipato allo studio previo consenso informato. La diagnosi di SM è stata posta da un neurologo esperto e basata su una precedente storia di malattia, esame fisico, analisi del liquido cerebrospinale e risonanza magnetica secondo i criteri di McDonald modificati (13). Lo stato neurologico dei pazienti è stato valutato usando la scala EDSS. La progressione della disabilità è stata valutata usando la scala MSSS (14). Il tasso di recidive annualizzato "Annualized Recidive Rate" (ARR), è stato calcolato nell'anno precedente la genotipizzazione.

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti inclusi nello studio.

Analisi biochimica

Il siero per l'analisi biochimica è stato ottenuto da campioni di sangue intero prelevati in provetta senza additivi. Ogni campione è stato centrifugato e il siero ottenuto è stato immediatamente processato per il dosaggio della 25-OH-D₃. In particolare, la concentrazione sierica di 25-OH-D₃ è stata misurata mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), utilizzando il kit di reazione Chromosystem "Chromsystems Instruments and Chemicals" e un sistema cromatografico dotato di pompa Waters 1525 Binary HPLC. La separazione cromatografica è stata condotta come segue: colonna analitica C18, temperatura della colonna 25°C, tasso di flusso 0,7 mL/minuto, lunghezza d'onda 265 nm e volume d'iniezione del campione 50 µL. La separazione cromatografica è stata eseguita con eluizione isocratica con tempo di ritenzione di 4,2 minuti. In accordo con le indicazioni del produttore, si definisce grave carenza di 25-OH-D₃ quando i livelli sierici sono inferiori a 15 µg/L, insufficienza per livelli compresi tra 20 e 30 µg/L, e sufficienza per livelli superiori a 30 µg/L.

Analisi molecolare

Il DNA di ciascun soggetto incluso nello studio è stato estratto da un'aliquota di 200 µL di sangue intero prelevato in EDTA, utilizzando un kit commerciale di estrazione (Qiagen), e conservato a -80 °C fino all'analisi. La qualità del DNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% e successiva quantificazione allo spettrofotometro. L'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide ("Single Nucleotide Polymorphisms", SNPs) è stata condotta utilizzando la tecnologia Taq-man su real-time PCR 7500 (Applied Biosystems). Le caratteristiche delle varianti genetiche

Tabella 1*Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti e dei controlli*

	Pazienti (n=105)	Controlli (n=160)
Età (anni)	39 (9,9)	45 (9,6)*
Sesso, n (maschi/femmine)	25/80	84/76
Durata della malattia (anni)	10,6 [2,4 – 20,1]	-
Età di esordio di SM	28,0 (7,9)	-
Tipo di SM (n): RR/SP/PP	90/14/1	-
EDSS	2 [1-5]	-
MSSS	3,2 [1,4 – 5,4]	-
ARR	1 [1-2]	-
25-OH-D ₃ (µg/L)	21,8 (7,2)	38,1 (8,2)*

*I dati sono espressi come media (DS) o mediana [range interquartile]***P < 0,0001**SM, sclerosi multipla; RR, recidivante-remittente; SP, secondariamente progressiva; PP, primariamente progressiva;**EDSS, expanded disability status scale; MSSS, multiple sclerosis severity score; ARR, annualized relapse rates*

analizzate sono riportate nella Tabella 2. Le condizioni utilizzate per la PCR sono state: 60 °C per 30 secondi, 95 °C per 10 minuti; in seguito 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 30 secondi, infine uno step a 60 °C per 30 secondi. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 20 µL (1 µL di DNA, 10 µL di TaqMan Genotyping Master Mix, 8,5 µL di acqua, 0,5 µL di Assay).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software SPSS (versione 13.0). Per l'analisi di associazione genetica, tutti i genotipi sono stati valutati per l'equilibrio di Hardy-Weinberg utilizzando il test del chi-quadro. Le frequenze alleliche e genotipiche degli SNPs sono state confrontate mediante il test esatto di Fisher. Le variabili continue sono state espresse come mediana e range interquartile o media (DS), quando appropriato. Il confronto tra le variabili continue è stato effettuato mediante il test di Mann-Whitney. Il confronto dei valori di 25-OH-D₃ tra le tre classi genotipiche è stato effettuato mediante test ANOVA. Un valore di P < 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Determinazione di 25-OH-D₃

I livelli medi circolanti di 25-OH-D₃ sono risultati significativamente più bassi nei pazienti con SM rispetto ai controlli, i quali avevano tutti livelli sufficienti di 25-OH-D₃ (38,1±8,2µg/L vs 21,8±7,2µg/L, rispettivamente; P < 0,001). Nei pazienti con SM era prevalente (58%) l'insufficienza di 25-OH-D₃, il 26% presentava carenza e solo il 15% sufficienza.

Stratificando i pazienti con SM in base al sesso e all'età, abbiamo trovato livelli di 25-OH-D₃ leggermente ridotti negli uomini rispetto alle donne (20,1 ± 6,2 µg/L vs 22,3 ± 7,3 µg/L, rispettivamente; P=0,15) e nessuna differenza statisticamente significativa legata all'età.

Analisi molecolare

La distribuzione genotipica degli SNPs del gene *CYP2R1* era in equilibrio di Hardy Weinberg. Dall'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche dei due SNPs, è emersa una differenza statisticamente significativa solo per il polimorfismo rs10766197 (Tabella 3). L'analisi della distribuzione del rs10766197 in base alla concentrazione di 25-OH-D₃ ha rivelato che i pazienti portatori del genotipo AA presentavano livelli più bassi di 25-OH-D₃ rispetto ai pazienti con genotipo GG o GA, sebbene non statisticamente significativi: GG 22,3±6,8 µg/L, GA 22,2±8 µg/L e AA 19,2±4,3 µg/L (P=0,08). Inoltre, l'analisi dell'effetto del rs10766197 su età di insorgenza della malattia, EDSS, MSSS e ARR non ha rivelato alcun effetto dello SNP sul decorso della malattia. Tuttavia, prendendo in considerazione le differenze legate al sesso, è emerso che i pazienti di sesso maschile portatori dell'allele A in omozigosi (AA) presentavano un decorso della malattia più grave rispetto ai pazienti di sesso femminile con genotipo AA (EDSS=4 [IQR 2-6] e 2 [1-4], rispettivamente in maschi e femmine; P=0,02. MSSS=4,9 [IQR 2,7-8] e 2,9 [0,8-5,4], rispettivamente maschi e femmine; P=0,04). Il rs10741657 non è risultato in associazione con alcuna delle variabili cliniche o biochimiche prese in considerazione nei pazienti con SM (dati non mostrati).

Tabella 2*Caratteristiche degli SNPs analizzati del gene CYP2R1*

Gene	Regione cromosomica	SNP	Allele ancestrale	Allele minore	Localizzazione SNP
CYP2R1	11p15.2	rs10741657	G	A	Promotore
		rs10766197	G	A	Promotore

*SNP, single nucleotide polymorphism***Tabella 3***Analisi del rs10766197 del gene CYP2R1 in pazienti con Sclerosi Multipla e controlli*

	Genotipo	Pazienti (n=105)	Controlli (n=160)	OR (95% IC)	P
CYP2R1 rs10766197	GG	16 (15%)	51 (32%)	Reference	
	GA	48 (46%)	66 (41%)	2,31 (1,18-4,54)	0,01
	AA	41 (39%)	43 (27%)	3,03 (1,5-6,15)	0,002
	G	80 (38%)	168 (53%)	Reference	
	A	130 (62%)	152 (47%)	1,79 (1,25-2,56)	0,001

IC, intervallo di confidenza 95%

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo selezionato e analizzato due SNPs nel gene che codifica per il *CYP2R1* scelti sulla base della letteratura, in cui è stata riportata l'associazione di entrambi gli SNPs con bassi livelli di 25-OH-D₃ in pazienti con asma e diabete; entrambe le condizioni cliniche e la SM condividono una patogenesi su base autoimmunitaria (15, 16). In particolare, sia lo SNP rs10741657 sia lo SNP rs10766197 si trovano nella regione del promotore del gene che codifica per il *CYP2R1* e sono entrambi caratterizzati dalla sostituzione nucleotidica di una guanina con una adenina.

Nel nostro studio, esplorando l'associazione tra la 25-OH-D₃, le varianti del gene *CYP2R1* e la SM, abbiamo trovato livelli significativamente più bassi di 25-OH-D₃ nei pazienti rispetto ai controlli e un'associazione tra l'allele minore A del gene *CYP2R1* rs10766197 e il rischio di SM. L'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche non ha rivelato nessuna differenza statisticamente significativa per rs10741657 del gene *CYP2R1* tra pazienti e controlli.

Questo è il primo studio nel quale è stata identificata una potenziale influenza del rs10766197 del gene del *CYP2R1* sul rischio di sviluppare SM. Recentemente, Laursen et al. hanno identificato una significativa associazione di un altro SNP del gene del *CYP2R1* con il rischio aumentato di sviluppare SM (17) in uno studio trasversale sulla popolazione danese. Un dato estremamente interessante emerso dal nostro studio è

l'associazione del rs10766197 con la progressione della malattia solamente nei pazienti di sesso maschile.

È ben documentato in letteratura che la SM, così come la maggior parte delle malattie autoimmunitarie, è caratterizzata da un dimorfismo sessuale che influenza sia l'incidenza che la severità della malattia. In generale, è stato riportato un più alto rischio di sviluppare la SM nelle donne, con un rapporto femmina: maschio di 2:1 – 3:1; di contro, i pazienti affetti da SM di sesso maschile presentano un'evoluzione della disabilità più rapida ed in generale un decorso peggiore della malattia (18-20).

Sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare le differenze legate al sesso osservate nei pazienti con SM. Innanzitutto, è stato proposto un ruolo degli ormoni sessuali. Diverse evidenze hanno rivelato che gli estrogeni hanno un effetto sul sistema immunitario (21). Inoltre, una sinergia tra il 17-β-estradiolo (E2) e la vitamina D₃ è stata descritta in studi sperimentali su modelli murini di encefalomielite autoimmune (22). In particolare, la vitamina D₃ potrebbe stimolare la sintesi locale di E2 a livello cerebrale incrementando l'espressione del gene *CYP19A1*, che codifica per l'enzima che catalizza la conversione di androgeni in estrogeni nelle cellule gliali (23). E2, a sua volta, è un importante regolatore del metabolismo della vitamina D₃, potenziando i suoi effetti immunosoppressivi (24). Corrales et al., analizzando la relazione tra la forma biologicamente attiva della vitamina D₃, ovvero la 1,25-OH₂-D₃, e gli ormoni sessuali femminili nei pazienti con SM, hanno trovato che la 1,25-OH₂-D₃ aveva un effetto immunomodulatore maggiore nelle donne rispetto agli

uomini (25). Studi su animali hanno rivelato che E2 potrebbe indurre l'accumulo di 1,25-OH₂-D₃ nelle femmine sia sopprimendo il trascritto del CYP24A1 (principale via di inattivazione della vitamina D), sia potenziando l'espressione del gene del VDR nel SNC (22). In aggiunta al loro ruolo sul sistema immunitario, sia gli estrogeni sia la 1,25-OH₂-D₃, svolgono un importante ruolo neuroprotettivo nel SNC. Gli estrogeni e la vitamina D₃ potrebbero, quindi, agire in sinergia per rallentare la progressione della malattia nelle donne. Pertanto, i soggetti di sesso maschile affetti da SM portatori delle varianti genetiche associate a ridotti livelli di vitamina D sono più suscettibili a una rapida progressione della malattia rispetto alle donne con SM portatrici della stessa variante grazie all'effetto protettivo esercitato dagli estrogeni. Nel nostro studio, abbiamo evidenziato che i soggetti con SM di sesso maschile portatori dell'allele minore A in omozigosi del rs10766197 del gene del CYP2R1 avevano un valore di EDSS e MSSS più alto e livelli sierici di 25-OH-D₃ più bassi rispetto alle donne con SM, portatrici dello stesso allele in omozigosi. Tuttavia, i livelli sierici di 25-OH-D₃ non erano significativamente differenti tra uomini e donne probabilmente a causa del numero relativamente piccolo di pazienti inclusi nello studio. Diversi Autori hanno mostrato che soggetti portatori del genotipo AA del rs10766197 del gene del CYP2R1 hanno livelli più bassi di 25-OH-D₃ rispetto ai soggetti portatori del genotipo GG, dopo aggiustamento per potenziali predittori, quali età, stagione e sesso (23, 24).

In conclusione, questo è il primo studio che ha identificato un ruolo del CYP2R1 sia nel rischio di sviluppare SM che nella progressione della malattia nei soggetti di sesso maschile. Ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere la complessa interazione tra fattori genetici, ambientali e ormonali nel differente sviluppo e progressione della SM nei maschi e nelle femmine.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Grant WB. Hypothesis - ultraviolet-B irradiance and vitamin D reduce the risk of viral infections and thus their sequelae, including autoimmune diseases and some cancers. *Photochem Photobiol* 2008;84:356-65.
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:1146-60.
- Smolders J, Thewissen M, Peelen E, et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2009;4:e6635.
- Nystad AE, Wergeland S, Aksnes L, et al. Effect of high-dose 1.25 dihydroxyvitamin D₃ on remyelination in the cuprizone model. *APMIS* 2014;122:1178-86.
- Bivona G, Agnello L, Pivetti A, et al. Association between hypovitaminosis D and systemic sclerosis: True or fake? *Clin Chim Acta* 2016;458:115-9.
- Snellman G, Melhus H, Gedeberg R, et al. Seasonal genetic influence on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a twin study. *PLoS One* 2009;4:e7747.
- Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK, et al. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and CYP2R1 genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Nutr* 2013;143:17-26.
- Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2016;37:261-7.
- Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, et al. VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D gene polymorphism analyses in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Biochem Genet* 2017;55:183-92.
- Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180-8.
- Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, et al. Genome wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010;19:2739-45.
- Caruso A, Bellia C, Pivetti A, et al. Effects of EPHX1 and CYP3A4 polymorphisms on carbamazepine metabolism in epileptic patients. *Pharmgenomics Pers Med* 2014;7:117-20.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
- Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144-51.
- Ramos-Lopez E, Bruck T, Jansen P, et al. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:631-6.
- Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T et al. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signaling pathway. *Respir Res* 2006;7:60.
- Laursen JH, Søndergaard HB, Albrechtsen A, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D levels in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015;21:1414-22.
- Bove R, Chitnis T. Sexual-disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol* 2012;149:201-10.
- Golden LC, Voskuhl R. The importance of studying sex differences in disease: the example of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2017;95:633-43.
- Sadovnick AD. Differential effects of genetic susceptibility factors in males and females with multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2013;149:170-5.
- Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanita* 2016;52:205-12.
- Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, et al. Estrogen controls vitamin D₃-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D₃ metabolism and receptor expression. *J Immunol* 2009;183:3672-81.
- Krishnan AV, Swami S, Peng L, et al. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 2010;15:32-42.
- Correale J, Balbuena Aguirre ME, Farez MF. Sex-specific environmental influences affecting MS development. *Clin Immunol* 2013;149:176-81.

25. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan M. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D₃ immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Immunol* 2010;185:4948-58.
26. Arabi A, Khoueiry-Zgheib N, Awada Z, et al. *CYP2R1* polymorphisms are important modulators of circulating 25-hydroxyvitamin D levels in elderly females with vitamin insufficiency, but not of the response to vitamin D supplementation. *Osteoporos Int* 2017;28:279-90.
27. Barry EL, Rees JR, Peacock JL, et al. Genetic variants in *CYP2R1*, *CYP24A1*, and *VDR* modify the efficacy of vitamin D₃ supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2133-7.