

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Acción de la vitamina D en la expresión de la vía de regulación de TGF-beta en  
pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Lozano Ros

DIRIGIDA POR

Luis Antonio Álvarez-Sala Walther  
Luis López Fernández  
María Luisa Martínez Ginés



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**TESIS DOCTORAL**

**TÍTULO:** ACCIÓN DE LA VITAMINA D EN LA EXPRESIÓN DE LA VÍA DE  
REGULACIÓN DE TGF-BETA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS  
MÚLTIPLE RECURRENTE-REMITENTE

**Realizada por:** Alberto Lozano Ros

**En el centro:** Facultad de Medicina

**Programa de Doctorado:** Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

**Dirigida por:** Luis Antonio Álvarez-Sala Walther  
Luis López Fernández  
María Luisa Martínez Ginés

Madrid, 2024





*A Carlota y Marina*



*“La fuerza natural dentro de cada uno de nosotros es el mayor sanador de todos”*

**Hipócrates**



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría manifestar mi agradecimiento en primer lugar a mis directores de tesis por la oportunidad de poder haber realizado este trabajo y haber confiado en mí para su realización. A Luis López Fernández le debo gran parte de este trabajo, me has acompañado siempre con un apoyo enorme en todos los aspectos posibles. Has tenido la enorme paciencia de enseñar a un neófito como yo las distintas técnicas de laboratorio y procedimientos de investigación básica necesarios para poder llevar a cabo este trabajo, que sin duda me ha aportado un enorme conocimiento adicional a la parte clínica que tenía como médico. Tu entusiasmo hacia la investigación, tu amabilidad y tu predisposición infinita han sido una guía incuestionable para la realización de este trabajo. A María Luisa Martínez Ginés por haberme inculcado desde un inicio el entusiasmo por la patología desmielinizante y en concreto la esclerosis múltiple, siendo una referente para mí en mi desarrollo como neurólogo y estando siempre a mi lado en las dificultades. Este trabajo tiene mucho de ti. Y a Luis Antonio Álvarez-Sala Walther por su apoyo constante tanto científico como personal, imprescindible para poder llevar a cabo esta investigación.

En segundo lugar quiero dar las gracias a todo el equipo de la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Gregorio Marañón (José Manuel García Domínguez, Juan Pablo Cuello, Haydee Goicochea, Yolanda Higuera y Ariana Meldaña) por su apoyo incondicional siempre y por haber compartido tanto con vosotros a lo largo de estos años.

En tercer lugar quiero agradecer a mis padres por haber estado siempre a mi lado, por apoyarme en las distintas etapas de mi vida y creer en mí siempre. Me siento orgulloso de poder mostraros este trabajo que tiene una parte vuestra. Al resto de mi

familia (hermana, tíos, primos,...) que tanto me ha aportado desde que tengo conciencia.

A mi mujer Marina y a mi hija Carlota, sin duda las mujeres de mi vida, con las que formo la mejor unión posible. Marina, siempre a mi lado, apoyándome y sosteniéndome en todo momento y Carlota, que algún día leerá este trabajo y sabrá lo importantes que son para mí.

Por último, y no por ello menos importante, quiero agradecer a los pacientes su participación y sus ganas siempre de querer aportar al avance de una enfermedad como la esclerosis múltiple. El saber que he podido aportar mi granito de arena al conocimiento de la enfermedad me llena de inmensa satisfacción para seguir adelante hacia lo que me traiga el futuro.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	17
<b>RESUMEN</b> .....	21
RESUMEN .....	23
ABSTRACT .....	29
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	35
1.1 GENERALIDADES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	37
1.2 EPIDEMIOLOGÍA .....	38
1.3 ETIOLOGÍA .....	39
1.3.1 Factores genéticos .....	39
1.3.2 Factores ambientales .....	40
1.3.2.1 <i>Vitamina D</i> .....	41
1.3.2.2 <i>Agentes infecciosos</i> .....	43
1.3.2.3 <i>Tabaquismo</i> .....	43
1.3.2.4 <i>Factores relacionados con la dieta</i> .....	44
1.4 PATOGÉNESIS .....	44
1.4.1 Células T CD4+ .....	46
1.4.2 Células T CD8+ .....	47
1.4.3 Células B .....	48
1.4.4 Células Tregs .....	49
1.4.5 Macrófagos y microglía .....	50
1.4.6 Citoquinas .....	50
1.5 MANIFESTACIÓN CLÍNICAS .....	54
1.6 DIAGNÓSTICO .....	57
1.6.1 Resonancia magnética .....	58

1.6.2	Test de laboratorio .....	58
1.6.3	Potenciales evocados .....	59
1.6.4	Criterios diagnósticos .....	60
<b>1.7</b>	<b>TRATAMIENTO .....</b>	<b>62</b>
1.7.1	Tratamiento modificador de la enfermedad .....	62
1.7.2	Tratamiento sintomático de la enfermedad .....	65
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>67</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
3.1	HIPÓTESIS .....	73
3.2	OBJETIVOS .....	73
3.2.1	Objetivo principal .....	73
3.2.2	Objetivos secundarios .....	73
<b>4.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO .....	77
4.2	POBLACIÓN DEL ESTUDIO .....	77
4.2.1	Criterios de inclusión .....	77
4.2.2	Criterios de exclusión .....	78
4.3	CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL .....	78
4.4	PLAN DE VISITAS .....	78
4.5	MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	79
4.5.1	Aislamiento y cultivo de células T CD4+ .....	79
4.5.2	Aislamiento de RNA y extracción de cDNA .....	80
4.5.3	qRT-PCR .....	80
4.6	ACTIVIDAD CLÍNICO-RADIOLÓGICA .....	82
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	83

<b>5. RESULTADOS</b> .....	85
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES .....	87
5.2 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES RELACIONADOS CON TGF- $\beta$ Y SU RELACIÓN CON LA SUPLEMENTACIÓN CON VD .....	88
5.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES RELACIONADOS CON TGF- $\beta$ BAJO TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB Y SUPLEMENTACIÓN CON VD .....	95
5.4 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES RELACIONADOS CON TGF- $\beta$ Y ACTIVIDAD CLÍNICO-RADIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD .....	97
5.4.1 Rio-Score .....	97
5.4.2 Brote .....	99
5.4.3 EDSS .....	101
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	105
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	119
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	123
<b>9. ANEXOS</b> .....	145
9.1 ANEXO I. RIO-SCORE .....	147
9.2 ANEXO II. ESCALA AMPLIADA DEL ESTADO DE DISCAPACIDAD (EDSS) .....	148
9.3 ANEXO III. TABLA DE VARIABLES CUALITATIVAS/CUANTITATIVAS Y DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA INDIVIDUAL .....	155
9.4 ANEXO IV. CHANGES IN THE EXPRESSION OF TGF-BETA REGULATORY PATHWAY GENES INDUCED BY VITAMIN D IN PATIENTS WITH RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS .....	159



## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

<b>BHE</b>	Barrera hemato-encefálica
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea
<b>BMPRII</b>	Receptor II de proteína morfogenética ósea
<b>DMT</b>	Fármaco modificador de la enfermedad
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune experimental
<b>EDSS</b>	Escala ampliada del estado de discapacidad
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EMPP</b>	Esclerosis múltiple primaria progresiva
<b>EMRR</b>	Esclerosis múltiple recurrente-remitente
<b>EMSP</b>	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
<b>ERK1</b>	Miembro 1 de las quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>Rio-Score</b>	Índice de Rio
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>SCA</b>	Síndrome clínico aislado
<b>SMAD</b>	Proteína SMAD
<b>SMAD7</b>	Miembro 7 de las proteínas SMAD
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>Th</b>	Linfocitos T colaboradores
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa

<b>Tregs</b>	Linfocitos T reguladores
<b>VD</b>	Vitamina D
<b>VDR</b>	Receptor de la vitamina D
<b>ZMIZ1</b>	Miembro 1 de las proteínas reguladoras del STAT activado

## **RESUMEN**



## RESUMEN

**Título:** Acción de la vitamina D en la expresión de la vía de regulación de TGF-beta en pacientes con esclerosis múltiple recurrente – remitente

### **Introducción:**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC). Su etiología sigue siendo desconocida aunque se considera una enfermedad multifactorial, en la que factores genéticos y ambientales generan una disfunción del sistema inmune que termina ocasionando inflamación y neurodegeneración. La vitamina D (VD) es un factor ambiental relacionado con la EM que tiene un papel inmuno-regulador importante favoreciendo acciones anti-inflamatorias sobre el sistema inmune, tales como producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL10, TGF- $\beta$ ), reducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, IL17, IFN- $\gamma$ ) y modular la respuesta celular T hacia un fenotipo inmuno-regulador.

TGF- $\beta$  es una superfamilia de citoquinas y factores de crecimiento que intervienen en procesos de crecimiento y diferenciación celular en el sistema inmune. Su principal función es anti-inflamatoria, favoreciendo el desarrollo y mantenimiento de las células T reguladoras FOXP3+, pero en presencia de IL-6, favorece la diferenciación hacia Th17, un fenotipo celular pro-inflamatorio relacionado con la EM. Existen diferentes vías de señalización que utiliza TGF- $\beta$  para llevar a cabo sus funciones, unas dependientes de proteínas SMAD y otras no dependientes de proteínas SMAD, que a su vez están reguladas a diferentes niveles. Las BMPs son proteínas morfogenéticas óseas, que se engloban dentro de la superfamilia de TGF- $\beta$ , que utilizan las vías SMAD y no SMAD de TGF- $\beta$  e intervienen en procesos de modulación de respuesta celular y

humoral en el sistema inmune. Los mecanismos por los que la VD es capaz de regular la vía de señalización de TGF- $\beta$  no son del todo conocidos.

### **Objetivos:**

- El objetivo principal fue caracterizar la variación de la expresión génica de *SMAD7* y *ERK1*, como representantes de las vías SMAD y no-SMAD de TGF- $\beta$  en pacientes con EM recurrente-remitente (EMRR) bajo suplementación con VD.
- Como objetivos secundarios caracterizamos la variación de la expresión génica de *ZMIZ1*, como representante de las proteínas reguladoras del STAT activado y de *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7* como representantes de BMPs en pacientes con EMRR bajo suplementación con VD.
- Analizamos la correlación entre los niveles séricos de VD y la expresión de los distintos genes seleccionados.
- Analizamos si el mecanismo de acción de los fármacos modificadores de la enfermedad (DMT) influye en la expresión génica de TGF- $\beta$ .
- Por último, analizamos si los datos de actividad clínico-radiológica de la enfermedad influyen en la expresión génica de los diferentes genes.

### **Material y métodos:**

Se incluyeron pacientes con EMRR reclutados de las consultas de Neurología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, en Madrid. Los pacientes debían presentar niveles insuficientes de VD en sangre (< 30 ng/ml) siguiendo los criterios de inclusión del estudio y fueron suplementados con VD (Calcifediol 0,266 mg, una ampolla vía oral al mes) siguiendo práctica clínica habitual. Se realizaron un total de

cuatro visitas por paciente. En la primera visita se recogieron los datos de actividad clínico-radiológica de la enfermedad basales, se extrajo sangre basal y se inició la suplementación con VD. Una segunda visita tuvo lugar al mes del inicio de la suplementación con una nueva extracción de sangre. Una tercera visita a los seis meses del inicio de la suplementación con nueva extracción sanguínea y finalmente la última visita al año del estudio donde se recogieron de nuevo los datos de actividad clínico-radiológica de la enfermedad.

Respecto a las muestras biológicas, se extrajeron linfocitos T CD4+ de la sangre periférica de los pacientes obtenida en los diferentes tiempos del estudio. Se aisló el RNA de los linfocitos T CD4+ y se sintetizó el DNA complementario (cDNA). Se seleccionaron genes candidatos representativos de las diferentes vías de TGF- $\beta$  (*SMAD7*, *ERK1*, *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7*). Los cambios en los genes seleccionados se midieron en 21 pacientes con EMRR al inicio, un mes y seis meses después del inicio de la suplementación con VD. La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante qRT-PCR. Para los datos de actividad clínico-radiológica de los pacientes se utilizó el Rio-Score, que engloba datos de brotes, lesiones de RM y discapacidad medida por EDSS. Para el análisis de los resultados, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cuantificar la expresión génica relativa con el software StepOnePlus v2.3 (Applied Biosystems) y su cuantificación mediante el software Expression Suite v1.3 (Life Technologies). Para identificar los genes con expresión diferencial se utilizaron el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba t (t-test) pareada. Se utilizó la correlación de Pearson para estudiar la asociación entre variables. Las variables clínico-radiológicas de la enfermedad se analizaron con el software IBM SPSS Statistics v26.0. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

## Resultados:

Se incluyeron un total de 21 pacientes en el estudio. La mediana de edad fue de 39 años (IQR, 20-56) y la mayoría eran mujeres (76,2%). Todos los pacientes estaban en tratamiento con DMT, siendo natalizumab el más frecuente. Los niveles séricos de VD aumentaron desde el inicio hasta los seis meses, estando en rango de suficiencia ( $\geq 30$  ng/ml) desde el primer mes. Se encontró un aumento de expresión media de *SMAD7* de 3,66 veces ( $p = 0.033$ ) desde el inicio hasta los seis meses, y de 5,32 veces ( $p = 0.008$ ) desde el primer hasta el sexto mes desde la suplementación. También se encontró un aumento de expresión media de *ERK1* a los seis meses en comparación con el primer mes (1,84 veces;  $p = 0.002$ ) desde la suplementación con VD. No se encontraron diferencias significativas de expresión con el resto de genes estudiados. Tampoco se encontró una correlación directa entre los niveles séricos de VD y la expresión de los distintos genes. Por otro lado, la expresión media de *BMPRII* cambió de forma diferencial en los pacientes no tratados con natalizumab frente a los tratados con natalizumab (3,66 veces;  $p = 0.001$ ). En cuanto a la actividad clínico-radiológica de la enfermedad medida a través del Rio-Score, también se observaron cambios en la expresión de *ERK1* basal en el grupo de mejora o estabilidad del Rio-Score (2,25 veces;  $p = 0.045$ ), *BMP2* basal (7,44 veces;  $p = 0.008$ ) y tras seis meses de suplementación (3,92 veces,  $p = 0.023$ ) en el grupo de empeoramiento del Rio-Score y *BMP5* al primer mes (23 veces;  $p = 0.004$ ) también en el grupo de empeoramiento del Rio-Score. Por último, se encontró un aumento de expresión de *BMP2* basal (5,94 veces;  $p = 0.017$ ) en pacientes que tuvieron brotes y un aumento de expresión de *BMP5* basal (15.55 veces;  $p = 0.019$ ) en aquellos cuya EDSS empeoró.

## **Conclusiones:**

En nuestro estudio sugerimos que la VD podría estar afectando a la regulación génica de las vías SMAD y no-SMAD de TGF- $\beta$ , teniendo por tanto un papel crucial en la inmunorregulación que ejerce esta citoquina en los distintos procesos asociados a la enfermedad. La VD no está influenciando en la expresión del resto de genes estudiados. Así mismo, tampoco se encontró una relación directa entre los niveles séricos de VD y la expresión génica de TGF- $\beta$  por lo que se sugiere una regulación indirecta, más compleja, sobre estas vías. El bloqueo de la migración celular hacia el SNC en relación al tratamiento con natalizumab y que existan, por tanto, aparentes compartimentos periferia/SNC diferentes no parece ser determinante en la expresión regulatoria de TGF- $\beta$ . Se encontró una desregulación de la vía de señalización de BMP en los pacientes en función de las características clínico-radiológicas de la enfermedad, aunque no se relacionaban con los niveles de VD, ni cambiaban en función de la normalización de la misma.



## **ABSTRACT**

**Title:** Role of vitamin D in the expression of the TGF-beta regulatory pathway in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.

### **Background:**

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease affecting the central nervous system (CNS). Its aetiology remains unknown although it is considered a multifactorial disease, in which genetic and environmental factors generate a dysfunction of the immune system that leads to inflammation and neurodegeneration. Vitamin D (VD) is an environmental factor related to MS that has an important immune-regulatory role favoring anti-inflammatory actions on the immune system, such as production of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL10 and TGF- $\beta$ ), reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL17 and IFN- $\gamma$ ) and modulating the T cell response towards an immune-regulatory phenotype.

TGF- $\beta$  is a superfamily of cytokines and growth factors involved in cell growth and differentiation processes in the immune system. Its main role is anti-inflammatory, favoring the development and maintenance of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells, but in the presence of IL-6, it favors differentiation towards Th17, a pro-inflammatory cell phenotype related to MS. There are different signaling pathways used by TGF- $\beta$  to carry out its functions, some dependent on SMAD proteins and others not dependent on SMAD proteins, which in turn are regulated at different levels. BMPs are bone morphogenetic proteins, which are included within the TGF- $\beta$  superfamily, which use the SMAD and non-SMAD pathways of TGF- $\beta$  and are involved in processes of

modulation of cellular and humoral response in the immune system. The mechanisms by which VD is able to regulate the TGF- $\beta$  signaling pathway are not entirely known.

### **Aims:**

- The primary aim was to characterize gene expression variation of *SMAD7* and *ERK1*, as representatives of the SMAD and non-SMAD pathways of TGF- $\beta$  in patients with relapsing-remitting MS (RRMS) under VD supplementation.
- As secondary aims we characterized the variation of gene expression of *ZMIZ1*, as representative of activated STAT regulatory proteins and of *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* and *BMP7* as representatives of BMPs in RRMS patients under VD supplementation.
- We analyzed the correlation between serum VD levels and the expression of the different selected genes.
- We analyzed whether the mechanism of action of disease-modifying drugs (DMT) influences TGF- $\beta$  gene expression.
- Finally, we analyzed whether clinical-radiological disease activity data influence gene expression of the different genes.

### **Materials and methods:**

Patients with RRMS recruited from the Neurology Department of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón in Madrid were included. The patients had to present insufficient VD levels in blood (< 30 ng/ml) following the inclusion criteria of the study and were supplemented with VD (Calcifediol 0.266 mg, one ampoule orally per month) according to standard clinical practice. A total of four visits were made per patient. At the first visit, baseline clinical-radiological disease activity data were

recorded, baseline blood was drawn and VD supplementation was started. A second visit took place one month after starting supplementation with a new blood draw. A third visit took place six months after the start of supplementation with a new blood draw and finally the last visit one year into the study, where the clinical-radiological disease activity data were collected again.

Regarding the biological samples, CD4+ T lymphocytes were extracted from the peripheral blood of the patients obtained at the different times of the study. RNA was isolated from CD4+ T lymphocytes and complementary DNA (cDNA) was synthesized. Candidate genes representative of the different TGF- $\beta$  pathways (*SMAD7*, *ERK1*, *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* and *BMP7*) were selected. Changes in selected genes were measured in 21 RRMS patients at baseline, one month and six months after initiation of VD supplementation. Relative quantification of gene expression was performed by qRT-PCR. For patients' clinical-radiological activity data, the Rio-Score was used, which includes data on relapses, MRI lesions and disability measured by EDSS. For analysis of the results, the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method was used to quantify relative gene expression with StepOnePlus v2.3 software (Applied Biosystems) and its quantification using Expression Suite v1.3 software (Life Technologies). Analysis of variance (ANOVA) and paired t-test were used to identify differentially expressed genes. Pearson's correlation was used to study the association between variables. The clinical-radiological variables of the disease were analyzed with IBM SPSS Statistics v26.0 software. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results:**

A total of 21 patients were included in the study. The median age was 39 years (IQR, 20-56) and the majority were women (76.2%). All patients were on treatment

with DMT, natalizumab being the most common. Serum VD levels increased from baseline to six months, being in the sufficiency range ( $\geq 30$  ng/ml) from the first month. A 3.66-fold ( $p = 0.033$ ) mean *SMAD7* expression increase was found from baseline to six months, and a 5.32-fold ( $p = 0.008$ ) increase from the first to the sixth month since supplementation. A mean *ERK1* expression increase was also found at six months compared to one month (1.84-fold;  $p = 0.002$ ) since VD supplementation. No significant differences in expression were found with the rest of the genes studied. No direct correlation was found between serum levels of VD and the expression of the different genes. On the other hand, mean *BMPRII* expression changed differentially in patients not treated with natalizumab versus those treated with natalizumab (3.66-fold;  $p = 0.001$ ). In regard to clinical-radiological disease activity measured via the Rio-Score, changes in baseline *ERK1* expression were also observed in the Rio-Score improvement or stability group (2.25-fold;  $p = 0.045$ ), *BMP2* at baseline (7.44-fold;  $p = 0.008$ ) and after 6 months of supplementation (3.92-fold,  $p = 0.023$ ) in the Rio-Score worsening group and *BMP5* at one month (23-fold;  $p = 0.004$ ) also in the Rio-Score worsening group. Finally, an increase in baseline *BMP2* expression (5.94-fold;  $p = 0.017$ ) was found in patients who had relapses and an increase in baseline *BMP5* expression (15.55-fold;  $p = 0.019$ ) in those whose EDSS worsened.

## **Conclusions:**

In our study we suggest that VD could be affecting the gene regulation of the SMAD and non-SMAD pathways of TGF- $\beta$ , thus playing a crucial role in the immune-regulation mediated by this cytokine in the different processes associated with the disease. VD is not influencing the expression of the rest of the genes studied. In addition, no direct relationship was found between serum levels of VD and TGF- $\beta$  gene

expression, suggesting an indirect, more complex regulation of these pathways. The blockade of cell migration into the CNS in relation to natalizumab treatment and that there are, therefore, apparent distinct peripheral/CNS compartments does not appear to be determinant in the regulatory expression of TGF- $\beta$ . Dysregulation of the BMP signaling pathway was found in patients as a function of the clinical-radiological characteristics of the disease, although these were not related to VD levels, or changed as a function of normalization of the VD.



# **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de la Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC) [1,2]. Desde el punto de vista patológico, la EM se caracteriza por la presencia de lesiones en el SNC, en las que ocurren los fenómenos de disrupción de la barrera hemato-encefálica (BHE), inflamación, desmielinización, pérdida de oligodendrocitos con gliosis reactiva y la consecuente degeneración neuronal y axonal [3,4]. Estas lesiones o “placas” fueron descritas por primera vez por Jean-Martin Charcot en el siglo XIX, llevando a cabo la primera correlación de los hallazgos anatómo-patológicos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad [5]. La EM es una enfermedad que se desarrolla principalmente en adultos jóvenes (entre 20-40 años), con un ratio de frecuencia mayor en mujeres (2-3:1), siendo la principal causa no traumática de discapacidad neurológica en este grupo de población [6,7]. La EM presenta un inicio y evolución muy heterogéneos entre distintos pacientes, y en el propio paciente a lo largo del tiempo [8].

La forma de presentación mas común de la EM (85%) consiste en la aparición de brotes de la enfermedad, variables en cuanto a intensidad y duración, seguidos de períodos de remisión totales o parciales. Esta forma de la enfermedad se denomina esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) y es la que presenta mejor respuesta a las terapias actuales. Con la evolución de la enfermedad, aproximadamente la mitad de estos pacientes presentan un deterioro neurológico progresivo, independiente de nuevos brotes, siendo mas resistentes a la acción de los tratamientos modificadores de la enfermedad (DMT por sus siglas en inglés). Esta segunda fase de la enfermedad se denomina esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP). Existe un porcentaje

pequeño de pacientes, alrededor del 10%, en los que la enfermedad se presenta de manera progresiva desde su inicio, sin presencia de brotes ni remisiones, denominándose esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP) [9,10].

La etiología de la EM es todavía desconocida, pero se sabe que tiene una fuerte base autoinmune. Se han descrito una serie de factores genéticos (variantes alélicas relacionadas con la respuesta inmune) y factores ambientales, tales como la vitamina D (VD), agentes infecciosos, tabaquismo, etc., que en combinación, darían una mayor susceptibilidad en el individuo para presentar una disfunción de su sistema inmune, responsable de los fenómenos de inflamación y neurodegeneración característicos de la enfermedad [11–14].

## **1.2 Epidemiología**

La prevalencia media mundial de la EM se sitúa en 33 casos por cada 100.000 habitantes, pero varía considerablemente entre países. Se ha visto que la latitud de cada país influye en las tasas de incidencia y prevalencia de la enfermedad, siendo más altas en aquellos países alejados del Ecuador. Regiones como América del Norte y Europa tienen las prevalencias más altas (140 y 108 casos por 100.000 habitantes, respectivamente) y Asia y África subsahariana las más bajas (2,2 y 2,1 casos por 100.000 habitantes, respectivamente) [15].

En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia y prevalencia de la EM en todo el mundo, lo que ha llevado a modificar la clasificación sobre zona de riesgo de EM. Actualmente se definirían como zonas de alto riesgo las que presentan una prevalencia de  $> 100$  casos por 100.000 habitantes, zonas de riesgo medio las que presentan una prevalencia de 50-100 casos por 100.000 habitantes, y zonas de riesgo bajo las que presentan una prevalencia de  $< 50$  casos por 100.000 habitantes. La

prevalencia en España se sitúa en torno a los 125 casos por 100.000 habitantes, aunque varía por sexo y edad. Estos datos situarían a nuestro país entre los de mayor riesgo de presentar EM [16,17].

Los pacientes con EM, en comparación con la población general, presentan una tasa de mortalidad más alta y una esperanza de vida mas corta, de aproximadamente 10 años, aunque según series danesas y noruegas recientes, la supervivencia de los pacientes con EM es mayor en las últimas seis décadas [18,19].

## **1.3 Etiología**

A pesar de que la etiología de la EM se considera todavía desconocida en muchos puntos, existen numerosas observaciones que establecen un origen autoinmune claro. Al igual que otras enfermedades autoinmunes, en la EM, el papel del sistema inmune mediado por la inmunidad innata y adquirida es primordial para el desarrollo de inflamación y neurodegeneración resultantes de la enfermedad. La EM se considera que tiene un origen multifactorial, en el que participan factores ambientales que sobre un individuo, genéticamente predispuesto, ocasionan una disfunción en su sistema inmune [20].

### **1.3.1 Factores genéticos**

El papel de los factores genéticos en el desarrollo de la EM esta fundamentado en diversas observaciones epidemiológicas. Se sabe que el riesgo de padecer EM en la población general es de aproximadamente un 0.1%, mientras que el riesgo para familiares de primer grado de un paciente con EM asciende hasta un 3-5% [21,22]. Existe también una concordancia entre gemelos monocigotos del 30%, frente a un 3-5% entre gemelos dicigotos [21,23].

El principal factor genético estudiado relacionado con el desarrollo de la EM es el alelo HLA-DRB1\*1501 y otros loci relacionados con este alelo. Ser heterocigoto para HLA-DRB1\*1501 confiere un odds ratio (OR) > 3 para desarrollar EM, mientras que ser homocigoto para el mismo alelo tiene un OR > 6 [24]. El mecanismo subyacente del alelo HLA-DRB1\*1501 no es del todo conocido, aunque se supone que interviene a través de la presentación de antígenos. Estudios más recientes de asociación de genoma completo han establecido correlación entre más de 150 polimorfismos de un único nucleótido y el riesgo de desarrollar EM. Estos estarían localizados cerca de genes de regulación del sistema inmune. La OR de la mayoría de estos polimorfismos es baja, situándose en torno a 1,1-1,2, aunque no se puede descartar un efecto combinado de los mismos [14,25,26].

Lo comentado anteriormente pone de manifiesto que la EM es una enfermedad poligénica, en donde otros factores ambientales se combinan para generar una mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, existen también estudios que han evidenciado que hay genes que pueden conferir protección o resistencia al desarrollo de la EM, como las observaciones de la población maltesa que presentan HLA-DRB1\*11 [27], o HLA-DRB1\*01, con mecanismos todavía por dilucidar [28].

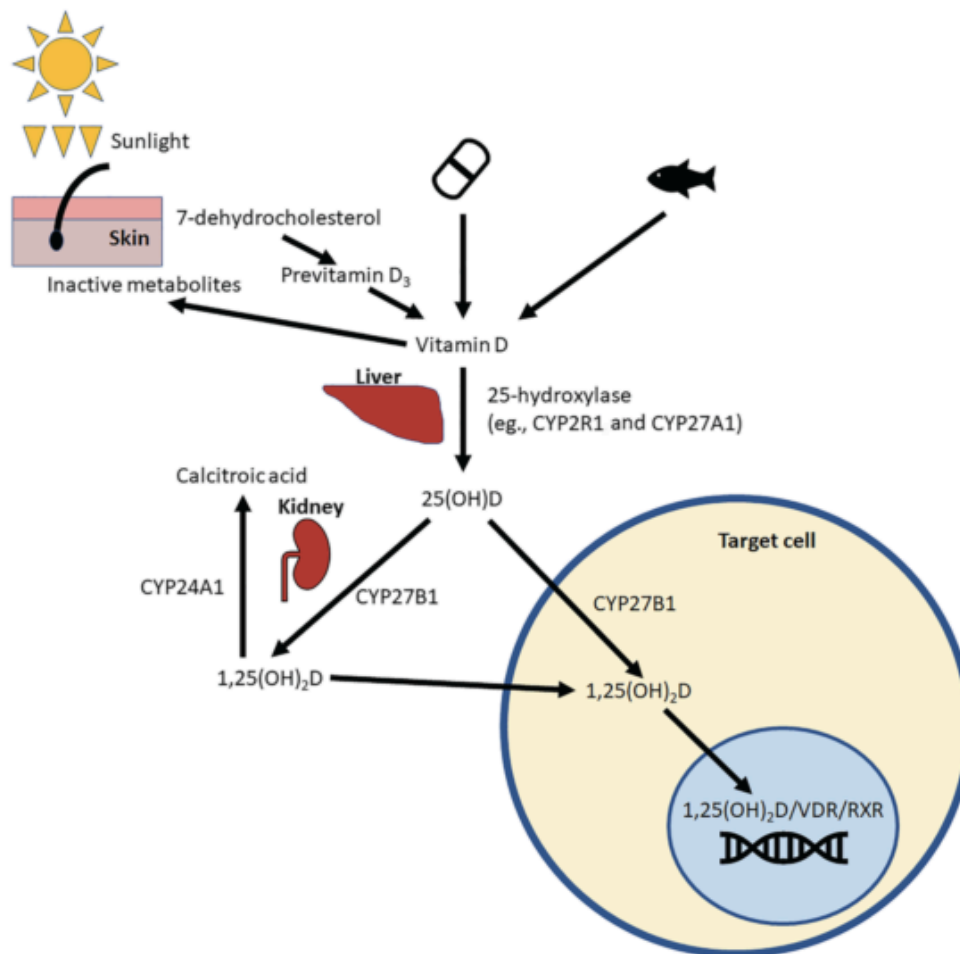
### **1.3.2 Factores ambientales**

A pesar de la relevancia de los factores genéticos, por sí solos no serían suficientes para el desarrollo de la enfermedad. Los estudios migratorios respaldan la hipótesis de que la exposición medioambiental es necesaria para la EM. Los inmigrantes adultos provenientes de zona de bajo riesgo, hacia zonas de alto riesgo de EM como Europa, tienen bajo riesgo de desarrollar EM, en contraposición con los niños nacidos de inmigrantes en Europa que tendrían un riesgo alto de EM [29].

### 1.3.2.1 Vitamina D

La VD es un grupo de compuestos secoesteroides liposolubles, entre los cuales la VD3 (Colecalciferol) es la forma principal sintetizada en animales. La VD se obtiene mediante su síntesis en la piel a través de la exposición a los rayos UVB, ó a través de la ingesta de alimentos. La VD sufre un proceso de doble metabolización, la primera en el hígado dando lugar a la 25(OH)D, y otra en el riñón dando lugar a la 1,25(OH)<sub>2</sub>D, que es su forma activa. La prevalencia de la EM aumenta con la latitud, y dicho gradiente latitudinal se correlaciona fuertemente con la exposición a los rayos UVB, que estimulan la producción de la VD en la piel. Los niveles sanguíneos bajos de VD y la reducción de su ingesta, junto con polimorfismos genéticos que generan niveles bajos de VD, establecen una potente relación causal entre la VD y la EM [30,31]. En pacientes con EM, se han observado niveles de VD en sangre más bajos durante los brotes respecto a las remisiones de la enfermedad [32], y el riesgo de un brote de EM puede estar significativamente disminuido en pacientes con niveles séricos medios (50-100 nmol/L) o altos (>100 nmol/L) de VD [33]. Por otro lado, niveles séricos de VD bajos (<50 nmol/L) en la enfermedad temprana es un factor de riesgo a largo plazo de actividad y progresión de la EM, incluyendo aparición de nuevas lesiones potenciadas en T2 y lesiones captantes de gadolinio en T1 en resonancia magnética (RM) cerebral [34]. La influencia de la VD en la EM se debe a los efectos pleiotrópicos que ésta ejerce sobre el sistema inmune y la inflamación [35]. La forma activa de la VD es capaz de estimular la inmunidad innata y modular la inmunidad adaptativa a través de la interacción con su receptor de membrana (VDR), ampliamente expresado en las células del sistema inmune, que tras unirse a regiones específicas del DNA influye en la expresión o represión de la transcripción génica. En estudios in vitro se ha observado que la VD es capaz de estimular la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como la

interleuquina-4 (IL-4), IL-10 o el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e inhibir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-12, IL17 o interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), en células mononucleares de sangre periférica. Además la VD modula la respuesta de las células T helper (Th) ejerciendo por tanto, un importante papel inmuno-regulador [36–38]. Los mecanismos por los que la VD ejerce sus funciones son complejos y no del todo conocidos (**Figura 1**).



**Figura 1.** Metabolismo y mecanismo de acción de la VD. La VD se obtiene a través de su síntesis en la piel por la exposición a los rayos UVB y por la ingesta de alimentos. Su metabolización incluye una hidroxilación en el hígado hacia 25(OH)D y otra en el riñón hacia 1,25(OH)<sub>2</sub>D, siendo la forma activa. 1,25(OH)<sub>2</sub>D se une al receptor VDR y al receptor retinoide X (RXR) en la célula diana, formando un complejo que se traslada al núcleo uniéndose al genoma en los elementos de respuesta a la VD para modular la expresión génica. Adaptado de (Yeh W. et al, 2020) [38].

### **1.3.2.2 Agentes infecciosos**

Por otro lado, diferentes estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la relación de diferentes agentes virales con la EM. El virus de Epstein-Barr (EBV) es el virus que mas fuertemente se ha relacionado. Alrededor del 90% de la población presenta anticuerpos para este virus, que indica un contacto pasado con el mismo, sin embargo, tener títulos elevados de anticuerpos para EBV, haber padecido la enfermedad de la mononucleosis infecciosa o coinfección de dos cepas distintas de EBV se han correlacionado con un mayor riesgo de desarrollar EM [39–41]. El mecanismo por el cual el EBV aumenta el riesgo de EM no es del todo conocido actualmente. Por un lado, la hipótesis mas plausible es la del mimetismo molecular [42]. Sin embargo y por otro lado, estudios mas recientes añaden un papel posible de transformación y migración de las células B como importantes para el desarrollo de la enfermedad [43]. Así mismo, no presentar anticuerpos para EBV, protegería para la EM [44]. Otro agente viral relacionado con la EM es el Virus Humano Herpes tipo 6 (HHV-6), cuyo DNA se ha encontrado tanto en el cerebro, líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero de pacientes con EM, relacionándose con la actividad clínica de la enfermedad [45,46]. Otros virus como el Virus Varicela-Zóster (VVZ), citomegalovirus (CMV) o incluso retrovirus endógenos humanos, se han relacionado también con el riesgo de padecer EM [47].

### **1.3.2.3 Tabaquismo**

Otro agente ambiental relacionado con la EM es el tabaquismo. Fumar se relaciona con mayor riesgo de presentar EM, incluso en fumadores pasivos [48,49], mayor agresividad de la enfermedad y mayor riesgo de conversión a una EMSP [50].

### **1.3.2.4 Factores relacionados con la dieta**

También hay una serie de factores ambientales, relacionados con la dieta, que se relacionan con la enfermedad. Por un lado esta la obesidad, que también se considera un factor de riesgo de desarrollo de EM. Presentar un índice de masa corporal (IMC) elevado en la infancia y adolescencia, confiere mayor riesgo de EM a posteriori [51]. Por otro lado, el consumo de sal en exceso se ha relacionado con mayor actividad de la enfermedad en pacientes adultos con EM [52], sin poderse encontrar esta relación en la población pediátrica con EM [53].

El papel de la microbiota intestinal se ha estudiado en profundidad en los últimos años, tanto en el modelo animal como en humanos, considerándose relevante en el desarrollo y evolución de muchas enfermedades autoinmunes como la EM [54].

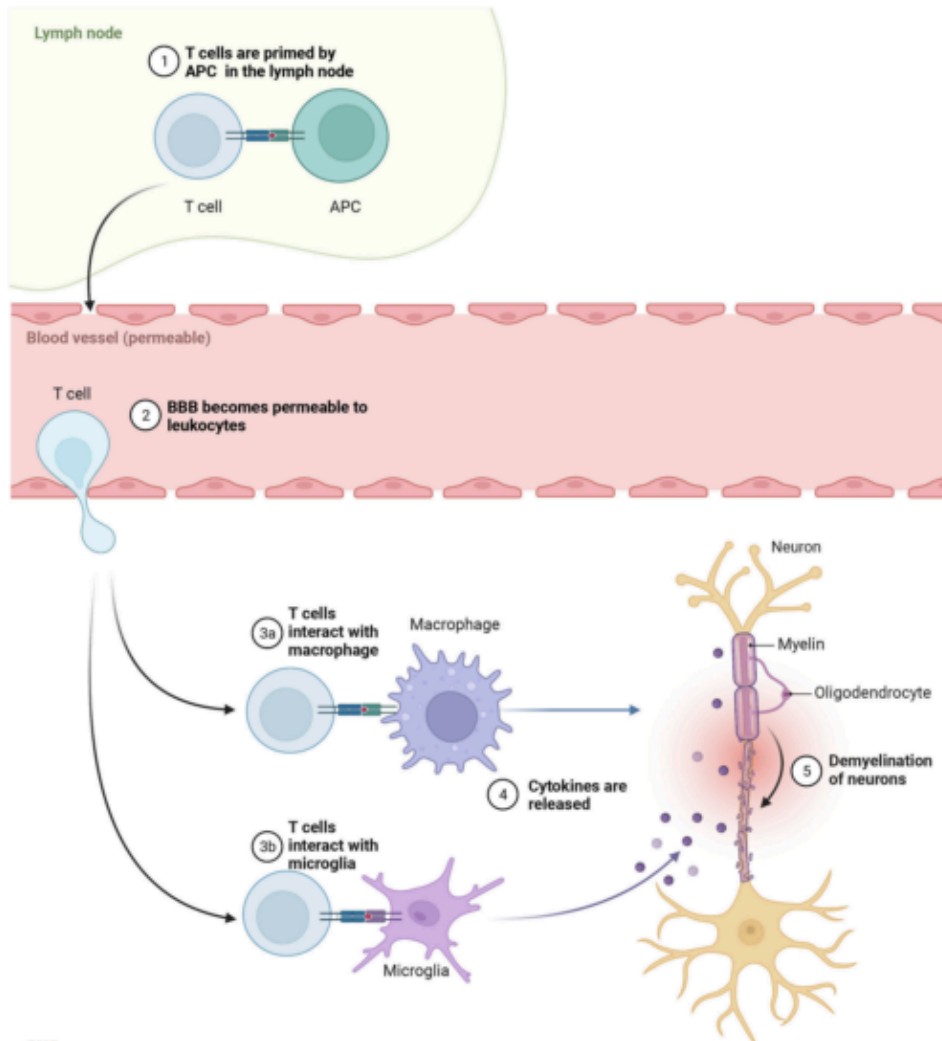
## **1.4 Patogénesis**

La patogénesis de la EM no se conoce todavía en su totalidad, pero si que existe un consenso sobre la implicación del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, formando parte del grupo de las llamadas enfermedades autoinmunes. No se conoce todavía con exactitud cual es el desencadenante por el cual el sistema inmune inicia la activación de la autoagresión sobre diferentes proteínas del SNC, fundamentalmente las proteínas que conforman la mielina de los axones y somas neuronales. Probablemente exista una predisposición genética que junto con determinados factores ambientales, desencadenan una disfunción del sistema inmune generando una inflamación en las estructuras del SNC [55].

Una disfunción del sistema inmune se sugiere como eje central de la patogenia de la EM en base a diferentes observaciones encontradas. La presencia de infiltrado inflamatorio de células leucocitarias en las placas desmielinizadas del SNC en los

estudios histológicos [56,57], la reducción del número y activación de las células T-reguladoras (Tregs) circulantes [58,59], o la detección de anticuerpos y clones leucocitarios específicos de antígenos del SNC [60], son algunos ejemplos de ello.

En la periferia, los linfocitos T CD4+ auto-reactivos se activarían tras interactuar con células presentadoras de antígenos (CPA), además de interactuar con linfocitos B y CD8+. La activación de estas células conlleva una cascada de expresión de diferentes moléculas de adhesión que les permite poder atravesar la BHE e introducirse en el interior del SNC. Una vez en el SNC, pueden inducir inflamación local por medio de la acción de citoquinas pro-inflamatorias, que a su vez activan a células de la inmunidad innata (macrófagos y microglía), que favorecen el reclutamiento de más linfocitos auto-reactivos que atraviesan la BHE. El daño inflamatorio local genera que se liberen nuevos antígenos que serían reconocidos por nuevos linfocitos auto-reactivos que se activarían nuevamente generando nuevas oleadas de inflamación en el SNC. Este mecanismo de propagación de epítomos se ha propuesto como uno de los mecanismos que podrían explicar las fases de brotes y remisión característicos de la EMRR [61,62] (**Figura 2**).



**Figura 2.** Papel de las células T auto-reactivas en la EM. En el ganglio linfático, los linfocitos T auto-reactivos se activan a través de las CPA, atraviesan la BHE y penetran en el SNC. En su interior, producen citoquinas pro-inflamatorias que activan a la microglía y macrófagos generando inflamación local. Adaptado de (Liu R. et al, 2022) [55].

### 1.4.1 Células T CD4+

La respuesta a la activación de las células T CD4+ a través de las CPA, junto con citoquinas específicas es la diferenciación en diferentes linajes celulares efectoras que tienen un papel fundamental en la patogenia de la EM. De entre las células T CD4+ efectoras, las más relevantes y estudiadas son las células Th1 y Th17 [55]. Las células Th1 se diferencian en respuesta a la activación en presencia de IL-12, y se caracterizan por expresar el factor de transcripción Tbet, que resulta en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2

y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), entre otras moléculas efectoras [63,64]. Las células Th17 se diferencia en respuesta a la activación en presencia de TGF- $\beta$ 1 e IL-6, o en presencia de IL-21 e IL-23, caracterizándose por expresar el factor de transcripción ROR $\gamma$ t que regula la expresión de *IL-17A*, *IL-17F*, *IL-21*, *IL-22*, *TNF- $\alpha$*  y el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (*GM-CSF*), entre otras moléculas efectoras [65–67]. Otro subtipo de células T CD4+ efectoras son las Th9, que producen IL-9, implicada en la regulación del equilibrio entre células Th17 y Tregs [68]. Las células Th1 y Th17 contribuyen a la patogenia de la EM de diferentes maneras. IFN- $\gamma$  es crucial en la mediación de la respuesta inmunitaria de las células T [69] y es capaz de inducir brotes en pacientes con EM [70,71]. En pacientes con EM, se ha observado una correlación entre el recuento alto de las células Th17 y la gravedad de la enfermedad [72]. Las células Th17 podrían producir glutamato al entrar en contacto con oligodendrocitos del SNC, destruyéndolos y liberando nuevos antígenos que activarían nuevos linfocitos T auto-reactivos. También las células Th17 serían capaces de migrar mas fácilmente a través de la BHE al expresar IL-23 y granzima B [55]. Además, en el modelo murino de EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la IL-23 favorece la producción de GM-CSF por parte de Th17, haciéndolas células mas encefalitogénicas contribuyendo a la inflamación del SNC [73,74].

#### **1.4.2 Células T CD8+**

Los linfocitos T CD8+ son hasta 10 veces más abundantes que los CD4+ en las lesiones crónicas desmielinizadas de EM. Además, éstas se localizan y se expanden clonalmente tanto en el espacio perivascular como en el parénquima del SNC, a diferencia de las CD4+, localizadas principalmente a nivel perivascular [75]. Las células CD8+ se correlacionan más con el daño neuronal y axonal que las CD4+ [76].

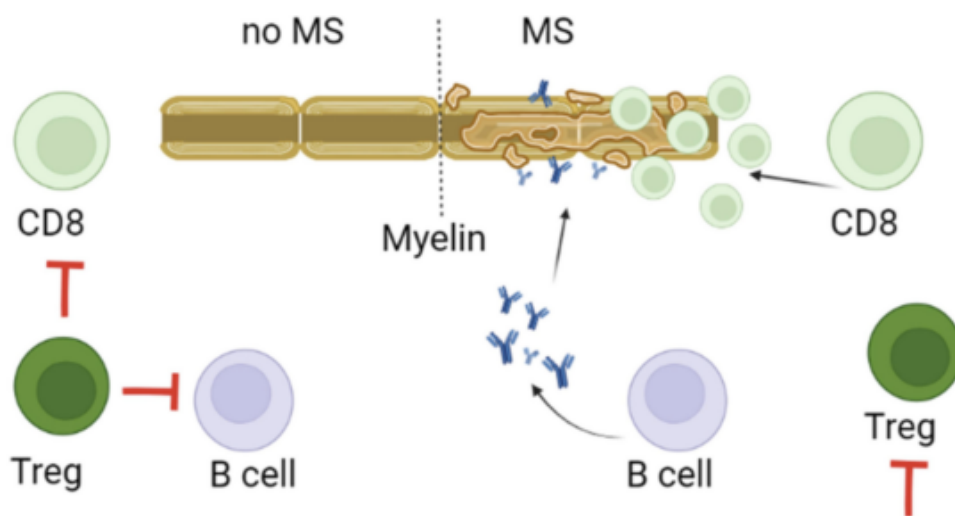
Son distintos los mecanismos por los que las células T CD8<sup>+</sup> pueden inducir destrucción neuronal y axonal. Por un lado, la secreción de gránulos líticos que contienen perforinas y granzimas, las cuales inducen la apoptosis de la célula. Por otro lado, inducen citotoxicidad mediada por la interacción de FasL con Fas expresado en neuronas [77,78]. Las células T CD8<sup>+</sup> también producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en grandes cantidades.

### **1.4.3 Células B**

Originalmente se ha considerado a la EM una enfermedad autoinmune mediada fundamentalmente por linfocitos T, existiendo un desequilibrio entre fenotipos pro y anti-inflamatorios. Si embargo, el papel de las células B en la inmunopatogénesis de la EM es cada vez mas reconocido, existiendo actualmente diversas terapias dirigidas específicamente contra las células B [79]. Las células B tienen un rol importante en la EM por medio de diversos mecanismos. Son capaces de actuar como CPA y activar a los linfocitos T auto-reactivos, producir citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a la inflamación del SNC, generar autoanticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del SNC y formar folículos linfoides ectópicos leptomeníngeos que contribuyen a perpetuar la respuesta inmune dentro del SNC [80–82]. Por otro lado, existen linfocitos B reguladores (Bregs) que son capaces de mediar en la tolerancia inmunológica y ejercer un efecto anti-inflamatorio, mediante la producción de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ . La IL-10 y la IL-35 son capaces de suprimir la respuesta Th1, mientras que TGF- $\beta$  tiene un papel principal inmuno-regulador mediante el mantenimiento de las Tregs [83–85].

### 1.4.4 Células Tregs

Las células Tregs, que expresan FOXP3+, tienen una función anti-inflamatoria por medio de la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  principalmente. Contribuyen al correcto funcionamiento del sistema inmune modulando la respuesta leucocitaria impidiendo que los linfocitos T auto-reactivos se conviertan en auto-agresivos. En pacientes con EM, respecto de controles sanos, se ha encontrado reducción del número de Tregs [86]. La pérdida de sus funciones facilitan las acciones pro-inflamatorias de los diferentes linajes efectores en la EM [87,88]. Otras funciones que se le asignan a las Tregs es que podrían también suprimir la acción de linfocitos T CD8+ citotóxicos y CPA, tanto por contacto directo, como por la acción de citoquinas liberadas [89] (**Figura 3**).



**Figura 3.** Rol de las células Tregs en la EM. Las Tregs impiden la diferenciación, proliferación y acción de las células autorreactivas Th17, CD8+ y células B. Una reducción de su número, junto con su disfunción, deriva en la proliferación de dichas células que contribuyen a la patogénesis de la EM. Adaptado de (Liu R. et al, 2022) [55].

### **1.4.5 Macrófagos y microglía**

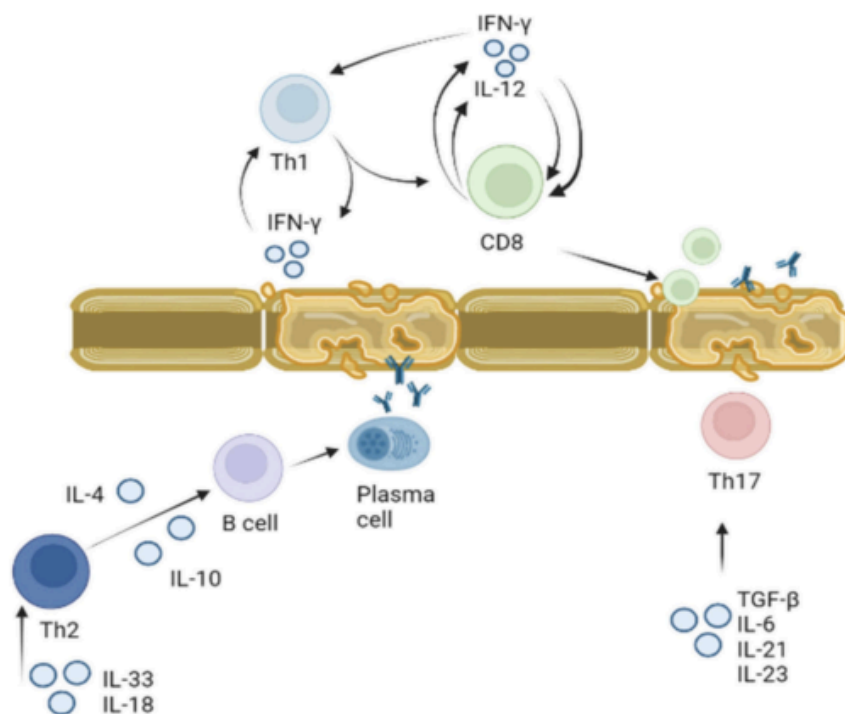
La inmunidad innata también juega un papel importante en la patogénesis de la EM. La microglía, los macrófagos residentes del SNC, realizan funciones de eliminación de desechos celulares y detección de patógenos en el SNC. Cuando se activan, en presencia del ambiente de citoquinas específico, cambian morfológicamente expresando marcadores de superficie específicos y adoptando fenotipos con funciones diferentes. Clásicamente se describieron un fenotipo pro-inflamatorio (M1) y un fenotipo anti-inflamatorio (M2), con programas transcripcionales específicos [90,91], sin embargo, esta clasificación M1/M2 se considera hoy en día obsoleta, al conocerse que la microglía muestra un fenotipo más dinámico y variado en sus estados de activación que van más allá de los extremos M1 y M2 [92].

Desde etapas iniciales de la enfermedad, se puede detectar microglía activada y macrófagos periféricos reclutados al SNC en las lesiones histológicas de la EM [93]. La microglía y los macrófagos son activados a través de citoquinas que producen los linfocitos T. La microglía activada produce más citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas que alteran la permeabilidad de la BHE y atraen a más macrófagos reclutados al SNC, interviniendo directa o indirectamente en la neurodegeneración asociada a la EM [90,94,95]. La microglía produce IL-12 e IL-23, que contribuye a la diferenciación de Th1 y Th17 respectivamente, además de producir TNF- $\alpha$ , entre otras citoquinas efectoras, que producen neurotoxicidad de manera directa [96].

### **1.4.6 Citoquinas**

Las citoquinas son pequeñas moléculas con funciones pleiotrópicas que modulan los diferentes procesos tanto sanos como patológicos en el organismo. El papel de las citoquinas en la patogénesis de la EM está bien documentado con la detección de

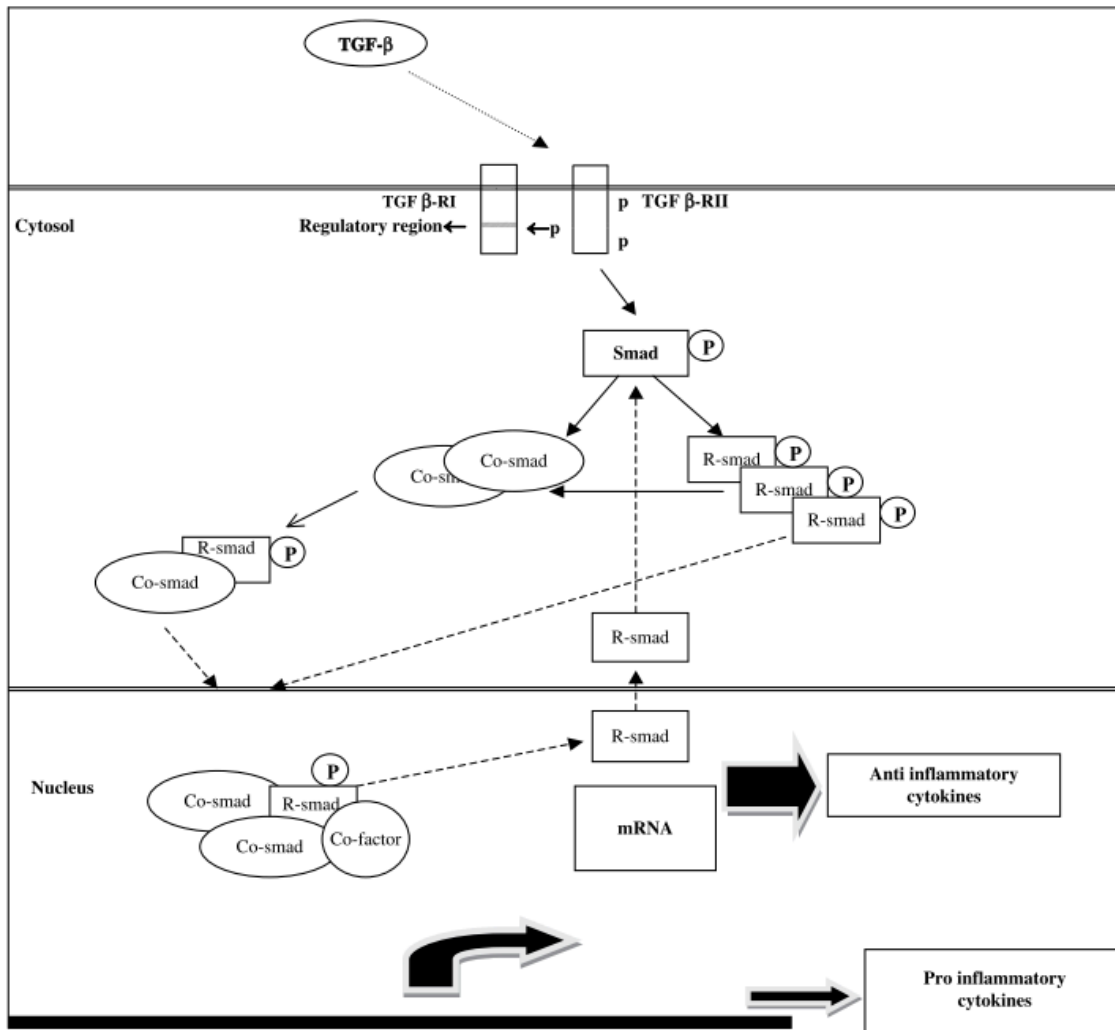
diversas moléculas que influyen en la inflamación local del SNC, la activación de linfocitos T auto-reactivos, alteración de la permeabilidad de la BHE facilitando el paso de células al SNC, entre otras acciones [55]. Se ha descrito el papel de citoquinas como la IL-12 e IL-23 que contribuyen para la diferenciación de las respuestas Th1 y Th17, así como el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , producidos por las células Th1, con un papel más que demostrado en la patogénesis de la EM [97,98] (**Figura 4**).



**Figura 4.** Rol de las citoquinas en la EM. La diferenciación de Th1 está regulada por IFN- $\gamma$ . Los linfocitos Th1 producen más IFN- $\gamma$  que estimula la diferenciación de linfocitos T CD8+ que contribuyen a la respuesta Th1 aportando más IFN- $\gamma$  e IL-12. La población reguladora Th2, estimulada por IL-18 e IL-33, produce IL-4 e IL-10 que activan a las células B, que pueden finalmente transformarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos dirigidos contra la mielina. La población Th17, estimulada por IL-21, IL-23, TGF- $\beta$  + IL-6, produce inflamación local en el SNC. Adaptado de (Liu R. et al, 2022) [55].

Mención importante tiene la citoquina TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  es una superfamilia de citoquinas y factores de crecimiento (TGF- $\beta$  en sus tres isoformas, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), activinas, etc.) que intervienen en multitud de procesos de crecimiento y diferenciación celular, incluyendo el sistema inmune. En el sistema inmune ejerce un papel dual inmuno-regulador, ya que por un lado inhibe la respuesta Th1 dependiente de IL-2 e IL-12 y favorece el mantenimiento de las Tregs FOXP3+, y por otro lado, en presencia de IL-6, favorece la respuesta Th17 [99,100].

TGF- $\beta$  utiliza diferentes vías de señalización internas para llevar a cabo sus funciones. La vía canónica es la llevada a cabo por una serie de proteínas denominadas SMAD. La activación y fosforilación del receptor de TGF- $\beta$  tipo II (TGF- $\beta$ RII) activa las proteínas R-SMAD (SMAD2/3). Éstas forman un complejo con el mediador Co-SMAD4, que se traslada al núcleo para regular la transcripción de genes específicos. Dos proteínas inhibidoras I-SMAD (SMAD6 y SMAD7) realizan un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la señalización del TGF- $\beta$ , compitiendo con las R-SMADs por la unión al receptor e inhibiendo así su fosforilación [99–103] (**Figura 5**). Además de la vía SMAD, TGF- $\beta$  puede llevar a cabo sus funciones por otras vías no dependientes de proteínas SMAD, que involucran a otras proteínas como Ras-ERK, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), c-Jun N-terminal quinasa (JNK), TAK-MKK3/6-p38, entre otras [104,105] y proteínas reguladoras, como las proteínas inhibidoras del STAT activado (PIAS) que son capaces de inhibir la transcripción de SMAD3 [106,107].



**Figura 5.** Vía canónica SMAD de TGF-β. Tras la unión con TGF-β, TGF-βRII se activa y se fosforila, activando a las proteínas R-SMAD que forman un complejo con Co-SMAD que se transloca al núcleo, uniéndose a las regiones promotoras de genes específicos que regulan la transcripción génica. Adaptado de (Mirshafiey A. et al, 2009) [103].

Las BMPs son uno de los miembros de la superfamilia de TGF-β, constituyendo un grupo de factores de crecimiento que intervienen en diferentes procesos de diferenciación y mantenimiento celular en distintos tejidos. Alrededor de 30 BMPs han sido descritas y clasificadas en subgrupos en función de similitudes de secuencia y funciones. Tras la unión con sus receptores, las BMPs utilizan vías de señalización conjuntas con TGF-β, bien dependientes y no-dependientes de SMAD para sus funciones [108–110]. En el SNC, actúan principalmente como promotores de la

diferenciación astrocitaria y como supresores de la diferenciación oligodendroglial [111]. También desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario, interviniendo en la diferenciación de las células T y la regulación de las respuestas celulares y humorales [112]. Se han observado niveles elevados de secreción de BMP2, BMP4 y BMP5 en células inmunes de pacientes con EMRR no tratados [113], así como expresión de *BMP2*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP7*, *BMPRII* y *pSMAD1/5/8* en lesiones de EM estudiadas mediante histología [114], sugiriendo que la señalización de las BMPs está alterada en la EAE y la EM, promoviendo una respuesta pro-inflamatoria en la enfermedad [114,115].

La VD se ha relacionado con las funciones inmuno-reguladoras de TGF- $\beta$ . Se ha observado que la VD puede aumentar los factores de transcripción que se unen al promotor de TGF- $\beta$ , activar vías alternativas de señalización interna mediadas por MAPK o modificar la vida media del RNAm de TGF- $\beta$ , lo que sugiere un mecanismo postranscripcional [116]. Sin embargo, los mecanismos directos o indirectos por los cuales la VD interactúa con TGF- $\beta$  aún no están claros.

## 1.5 Manifestaciones y formas clínicas

La EM es una enfermedad con una gran heterogeneidad clínica. La forma de presentación es diferente en cada paciente, así como su evolución posterior. Normalmente la enfermedad se va a presentar en forma de lo que se denomina “síndrome clínico aislado” (SCA), que sería la primera manifestación clínica de la enfermedad. Los síntomas dependerán de la localización en el SNC de la lesión inflamatoria. Las formas más comunes de presentación clínica son la neuritis óptica, los síndromes del tronco-encéfalo y médula espinal, aunque hay otras formas de presentación menos comunes que incluyen los síndromes corticales (**Tabla 1**).

Topografía	Síntomas
<b>Nervio óptico</b>	Pérdida de visión dolorosa monocular
<b>Médula espinal</b>	Hemiparesia, mono/paraparesia, hipoestesia, disestesia, parestesia, disfunción de esfínter urinario y/o fecal
<b>Tronco-encéfalo y cerebelo</b>	Diplopía, oscilopsia  Vértigo  Ataxia de la marcha, dismetría  Temblor intencional/postural  Paresia y/o hipoestesia facial
<b>Hemisferio cerebral</b>	Hemiparesia faciobraquial-crural  Hemihipoestesia faciobraquial-crural

**Tabla 1.** Síntomas de presentación comunes en la EM. Adaptado de (Oh J. et al, 2018) [18].

Los brotes de la enfermedad se van a presentar de manera subaguda a lo largo de horas o días, alcanzando una meseta que se puede extender durante varias semanas y posteriormente comenzar a recuperar de manera paulatina, expresión de la acción de los mecanismos de reparación del SNC. La recuperación de los brotes puede ser completa o incompleta, pudiendo quedar secuelas. En fases iniciales de la enfermedad, suele predominar la recuperación completa, pero en fases más avanzadas, donde existe menor reserva neuronal, la posibilidad de déficits neurológicos permanentes que ocasionen discapacidad funcional es mayor [19].

En 1996, Lublin FD. et al [117], definieron los fenotipos clínicos evolutivos de la EM. De esta forma, de los pacientes con EM, alrededor del 85% de los pacientes

presentan una forma clínica de la enfermedad caracterizada por aparición de brotes o recaídas, más o menos reversibles, intercalados con períodos de remisión. Esta forma de la enfermedad es la recidivante-remitente (RR). Después de 10-15 años, aproximadamente el 50% de estos pacientes cambian a una forma secundaria progresiva (SP). Alrededor de un 10% de los pacientes, manifiestan una evolución progresiva desde el inicio, sin presentar brotes o recaídas, siendo la forma primaria progresiva (PP). Algunos pacientes, pueden presentar excepcionalmente brotes durante el curso progresivo, siendo esta la forma progresiva-recidivante (PR). Con el paso de los años, el mayor entendimiento de la enfermedad, su patogénesis y la inclusión de nuevas herramientas diagnósticas, propiciaron una revisión sistemática de los fenotipos clínicos alcanzándose una nueva clasificación en 2013. En esta nueva clasificación, se mantuvieron los fenotipos iniciales descritos en 1996, aunque con algunas modificaciones, tales como considerar la forma PP independiente del resto, ante la ausencia de brotes desde el inicio, incluir en la clasificación evolutiva el SCA y excluir el síndrome radiológico aislado (debido a ausencia de síntomas y signos clínicos), definir el concepto de actividad clínica (definición de brote), actividad radiológica (aparición de nuevas lesiones potenciadas en T2 o aumento de tamaño de las mismas en resonancia magnética (RM) o aparición de lesiones captantes de gadolinio) y de progresión (incremento objetivo y documentado de la disfunción/discapacidad neurológica a lo largo de un periodo de tiempo, sin recuperación), siendo sólo aplicable a las formas progresivas de la enfermedad (SP y PP), entre otras modificaciones y/o aclaraciones (**Figura 5 y 6**) [118].

Síndrome clínico aislado	No activo
	Activo*
Enfermedad recurrente-remitente	No activo
	Activo*
*Actividad = brotes clínicos y/o RM (lesiones RM captantes de gadolinio; aumento/nuevas lesiones T2)	

**Figura 5.** Clasificación de 2013 de las formas RR de la EM. Descripción de actividad clínica y radiológica. Adaptado de (Lublin FD, 2014) [118].

Primaria progresiva (acumulación progresiva de discapacidad desde el inicio)  Enfermedad progresiva  Secundaria progresiva (acumulación progresiva de discapacidad después de un inicio con curso en brotes)	Activa* y con progresión#
	Activa* pero sin progresión
	No activa pero con progresión#
	No activa y sin progresión (enfermedad estable)
*Actividad = brotes clínicos y/o RM (lesiones RM captantes de gadolinio; aumento/nuevas lesiones T2)	
#Progresión medida mediante evaluación clínica al menos una vez al año	

**Figura 6.** Clasificación de 2013 de las formas progresivas de la EM. Descripción de actividad clínica, radiológica y progresión. Adaptado de (Lublin FD, 2014) [118].

## 1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la EM se basa en la demostración clínica y/o radiológica de lesiones diseminadas en distintas regiones del SNC y en el tiempo. Este concepto de diseminación en el espacio (DIS) y diseminación en el tiempo (DIT), antes de la llegada

de la RM, se basaba únicamente en el aspecto clínico (presentar dos brotes o recaídas de la enfermedad en dos regiones diferentes del SNC). Con la RM, se puede establecer DIS y DIT de manera más eficaz y temprana, lo que permite un diagnóstico precoz de la enfermedad, así como poder excluir diagnósticos alternativos similares. Además de la RM, existen otras pruebas paraclínicas que ayudan al diagnóstico, pronóstico y contribuyen al diagnóstico diferencial, como los test de laboratorio o los potenciales evocados (PE) [18,119].

### **1.6.1 Resonancia magnética**

La RM es la prueba paraclínica más sensible para la detección de lesiones desmielinizantes cerebrales y medulares en la EM, además de muy útil para excluir otras enfermedades similares [120]. Permite además monitorizar la actividad de la enfermedad en los pacientes, tanto en ensayos clínicos como en la práctica clínica habitual y evaluar la respuesta a los tratamientos [121]. Se introdujo por primera vez en los criterios diagnósticos de McDonald 2001 [122], y desde entonces ha sido una pieza fundamental de los mismos en las sucesivas revisiones y modificaciones de los criterios.

### **1.6.2 Test de laboratorio**

Existen distintas enfermedades sistémicas y del SNC que pueden presentarse clínicamente y tener imágenes de RM de una manera similar a la EM. No obstante, en el contexto de una presentación clínica típica de un SCA, la determinación de autoanticuerpos de otras enfermedades sistémicas o marcadores serológicos de infecciones, tienen una utilidad limitada. Sí sería aconsejable su determinación en

presentaciones clínicas atípicas, o cuando existen síntomas/signos sistémicos de otras enfermedades [123].

Mención importante es el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR). En la EM, más del 90% de los pacientes presentan síntesis intratecal de inmunoglobulina G (IgG). Aunque existen varios métodos semicuantitativos para su análisis, la síntesis intratecal de IgG se suele medir mediante el método de Tibbling [124]. De esta forma se mide el índice de IgG, cuyos valores normales se sitúan entre 0,3-0,7. Los valores por encima de 0,7 indican síntesis intratecal de IgG. Los métodos semicuantitativos tienen alta especificidad pero baja sensibilidad. Los métodos de determinación de síntesis intratecal de IgG más sensibles son los cualitativos y consisten en la medición de las bandas oligoclonales (BOC) en el LCR. La presencia de BOC en el LCR pero no en suero, es altamente sugestivo de EM en el contexto clínico típico, pero no llega a ser patognomónico, ya que otras enfermedades neurológicas o sistémicas se pueden encontrar [125].

### **1.6.3 Potenciales evocados**

Los PE miden la transmisión de un impulso eléctrico en el SNC por medio de la estimulación de un órgano sensitivo periférico. La desmielinización que provocan las lesiones de EM en las aferencias de estos órganos sensitivos genera una disminución o retraso de la transmisión del impulso nervioso que se puede detectar con esta técnica. Uno de los más utilizados son los PE visuales tras episodios de neuritis óptica, al considerarse marcadores no sólo diagnósticos, sino pronósticos de la EM [126,127].

#### 1.6.4 Criterios diagnósticos

Se han utilizado diferentes criterios diagnósticos en la EM a lo largo de los años. Inicialmente, los mas utilizados han sido los criterios diagnósticos de Poser, establecidos en 1983 [128]. Estos criterios se basan en pruebas clínicas y paraclínicas permitiendo establecer cuatro grados de certeza diagnóstica (definida o probable mediante datos clínicos y definida o probable con ayuda de laboratorio). Las pruebas paraclínicas incluyen pruebas de imagen, neurofisiología y análisis del LCR. Estos criterios permiten un diagnóstico acertado de la enfermedad, pero no temprano. Con el paso de los años, ante el mayor conocimiento de la enfermedad, la evolución de las técnicas de imagen, la necesidad de realizar un diagnóstico y tratamiento temprano para evitar el daño irreversible de la enfermedad, se propuso actualizar y modificar los criterios diagnósticos. En este sentido, nacen los criterios diagnósticos de McDonald, publicados por primera vez en 2001 [122]. Estos criterios basan el diagnóstico de la EM en la demostración de DIS y DIT, con un papel principal de la RM. Estos criterios se han revisado y modificado posteriormente en 2005 [129], 2010 [130] y 2017 [131], para simplificar su uso sin perder sensibilidad y especificidad. Con los nuevos criterios, la DIS puede demostrarse con la presencia de al menos una lesión, en al menos dos de las cuatro regiones del SNC (periventricular, cortical o yuxtacortical, infratentorial y médula espinal). La DIT puede demostrarse mediante la presencia simultánea de lesiones captantes y no captantes de gadolinio en una RM en cualquier momento, o presencia de una nueva lesión potenciada en T2 o lesión captante de gadolinio en una RM de seguimiento. Con los criterios de McDonald 2017, cobran mas presencia las BOC, ya que si son positivas, se equiparan al criterio radiológico de DIT (**Tablas 2, 3 y 4**) [131].

	Número de lesiones con evidencia objetiva clara	Datos necesarios adicionales para el diagnóstico de EM
≥ 2 ataques (brotes)	≥ 2	Ninguno
≥ 2 ataques (brotes)	1*	Ninguno
≥ 2 ataques (brotes)	1	DIS por un brote adicional en un sitio distinto del SNC o por RM
1 ataque (brote)	≥ 2	DIT por un brote adicional o por RM ó BOC en LCR
1 ataque (brote)	1	DIS por un brote adicional en un sitio distinto del SNC o por RM y DIT por un brote adicional o por RM ó BOC en LCR

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos de McDonald 2017 para el diagnóstico de EM en pacientes con un brote desde el inicio. \*así como evidencia histórica clara de un brote previo involucrando una lesión en una localización anatómica distinta. Adaptado de (Thompson AJ. et al, 2018) [131].

<b>Diseminación en espacio (DIS)</b>	≥ 1 lesión hiperintensa en T2 característica de EM en ≥ 2 de las cuatro áreas del SNC: periventricular, cortical/yuxtacortical, infratentorial y médula espinal
<b>Diseminación en tiempo (DIT)</b>	Presencia simultánea de lesiones captantes y no captantes de gadolinio en cualquier tiempo ó una nueva lesión hiperintensa en T2 o captante de gadolinio en una RM de seguimiento, respecto a una RM basal

**Tabla 3.** Criterios diagnósticos de McDonald 2017 para el diagnóstico de EM. Criterios de DIS y DIT. Adaptado de (Thompson AJ. et al, 2018) [131].

## EM progresiva primaria (EMPP)

1 año de progresión de la discapacidad (determinada retrospectivamente o prospectivamente) independiente de brotes clínicos

Más dos de los siguientes criterios:

- $\geq 1$  lesión hiperintensa en T2 característica de EM en una o más de las siguientes áreas del SNC: periventricular, cortical/yuxtacortical ó infratentorial
- $\geq 2$  lesiones hiperintensas en T2 en médula espinal
- Presencia de BOC en LCR

**Tabla 4.** Criterios diagnósticos de McDonald 2017 para el diagnóstico de EM en pacientes con curso clínico caracterizado por progresión desde el inicio. Adaptado de (Thompson AJ. et al, 2018) [131].

## 1.7 Tratamiento

La EM es una enfermedad que todavía no tiene un tratamiento curativo. El tratamiento de la EM se divide en el DMT, que incluye diferentes fármacos inmuno-moduladores e inmuno-supresores. Estos fármacos, han demostrado su eficacia a la hora de reducir la incidencia de brotes de la enfermedad, el número de lesiones desmielinizantes en la RM y la progresión de la atrofia cerebral. Por otro lado, está el tratamiento sintomático de la enfermedad, donde se incluyen tanto terapias farmacológicas como no farmacológicas, que van destinadas a mejorar los distintos síntomas asociados de la enfermedad.

### 1.7.1 Tratamiento modificador de la enfermedad

Actualmente, el DMT se busca que sea lo más precoz posible para prevenir la discapacidad a largo plazo en la enfermedad. Históricamente se discernía entre fármacos inmuno-supresores y fármacos inmuno-moduladores, que requieren de un uso

crónico para poder mantener la supresión sobre el sistema inmune y mantener inactiva la enfermedad. Actualmente hay disponible también terapias de reconstitución inmune, que permiten en ciclos cortos de tratamiento inducir cambios duraderos sobre el sistema inmune, controlando la actividad de la enfermedad. Inicialmente el DMT ha estado disponible para la EMRR, aunque actualmente existen también terapias para las formas progresivas de la EM. Otro concepto reciente en el tratamiento de la EM es “la ausencia de evidencia de actividad de la enfermedad” o NEDA, por sus siglas en inglés. El concepto de NEDA surge debido a que la actividad clínica de la EM en forma de brotes es sólo una pequeña muestra de la enfermedad, además de que la atrofia cerebral puede seguir progresando aunque no exista actividad inflamatoria. NEDA se define a partir de parámetros clínicos (NEDA-1 y NEDA-2; ausencia de brotes y progresión clínica, respectivamente), parámetros de RM (NEDA-3; ausencia de actividad en RM), datos de atrofia en RM (NEDA-4) y biomarcadores (NEDA-5; niveles de neurofilamentos en LCR). En la práctica clínica habitual, conseguir NEDA en el paciente ha intensificado la necesidad de iniciar un tratamiento temprano en la enfermedad [19].

Dentro de los fármacos inmuno-moduladores, se encuentran el interferón- $\beta$ , acetato de glatirámico, teriflunomida, dimetil-fumarato y fumarato de diroximel. Interferon- $\beta$ , en sus distintas formas y presentaciones, no tiene un mecanismo de acción del todo conocido, aunque se sabe que es una citoquina que es capaz de modular la respuesta inmune hacia un fenotipo más anti-inflamatorio [132]. Acetato de glatirámico es un péptido formado de cuatro aminoácidos con una estructura similar a la proteína básica de la mielina, cuyo mecanismo de acción se basa en la interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad y el receptor del linfocito T, siendo un importante inductor de la respuesta anti-inflamatoria mediada por Th2 [133]. Teriflunomida es un fármaco oral que inhibe la enzima dihidroorotato deshidrogenasa,

enzima limitante en la síntesis *de novo* de las pirimidinas, interfiriendo en la síntesis de DNA en los linfocitos, teniendo por tanto un mecanismo antiproliferativo [134]. Dimetil-fumarato es otro fármaco oral que es capaz de inducir apoptosis de células T, producir un viraje de la respuesta hacia Th2 e impedir la translocación al núcleo celular de un factor de transcripción pro-inflamatorio NFκβ, además de estar asociado con funciones neuroprotectoras [135,136]. Fumarato de diroximel es un fármaco agonista del receptor del ácido nicotínico, capaz de activar la vía del factor nuclear Nrf2, que juega un papel crucial en la respuesta celular ante el estrés oxidativo [137].

En cuanto a los fármacos inmuno-supresores, están disponibles natalizumab, fingolimod y ocrelizumab. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante dirigido contra la subunidad α-4 de la integrina VLA-4, necesaria para la adhesión de los linfocitos T al endotelio vascular. Su mecanismo de acción consiste en ejercer un bloqueo a la entrada de los linfocitos al SNC [138]. Fingolimod es un análogo de la esfingosina que se une al receptor de esfingosina-1-fosfato bloqueando la salida de los linfocitos T desde los ganglios linfáticos al torrente sanguíneo [139]. Existen en la actualidad otros moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato con diferentes grados de selectividad por los subtipos de receptores (siponimod, ozanimod y ponesimod) [140]. Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno CD20, expresado en los linfocitos B, por lo que su administración genera una depleción específica de la población celular B [141]. Recientemente se ha incorporado otra molécula anti-CD20 disponible para el tratamiento de la EMRR (ofatumumab) y otra existente en vía de desarrollo (ublituximab) [142]. Existen otros fármacos inmuno-supresores clásicos como la azatioprina, ciclofosfamida o la mitoxantrona, entre otros, que actualmente tienen un papel muy residual en el manejo de la EM.

Respecto a las terapias de reconstitución inmune, están disponibles alemtuzumab y cladribina. Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno CD52, cuyo mecanismo de acción es producir una depleción de las células portadoras de dicho antígeno (linfocitos T y B, células *natural killer*, la mayoría de macrófagos y monocitos, células dendríticas y la mayoría de granulocitos, excepto los neutrófilos) [143]. Cladribina es un análogo clorado de la desoxiadenosina resistente a la degradación por la enzima adenosina desaminasa. En el interior de las células inmunes (principalmente linfocitos T y B), al ser resistente a su degradación, se acumula en su forma activa, alterando la síntesis del DNA y provocando la apoptosis tanto de células en división como quiescentes [144].

Existen en la actualidad otras muchas moléculas en investigación, en fase de ensayo clínico, dirigidas contra otras dianas del sistema inmune. El cada vez mayor arsenal terapéutico, con sus respectivos mecanismos de acción y perfiles de seguridad, junto con el mayor conocimiento de la enfermedad, hace que el DMT en la EM deba ser cada vez más específico e individualizado, siendo necesaria la búsqueda incesante de biomarcadores de respuesta terapéutica que permitan optimizar mejor el tratamiento y minimizar los posibles efectos secundarios.

### **1.7.2 Tratamiento sintomático de la enfermedad**

El tratamiento sintomático de la EM engloba los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos dirigidos a mejorar los síntomas resultantes del daño en el SNC. Estos tratamientos en su mayoría no son específicos de la enfermedad. El tratamiento de los brotes de la enfermedad se suele realizar con corticoides orales o intravenosos, durante 3-5 días, siendo la metilprednisolona la más utilizada. En casos donde no sea suficiente, se pueden emplear otras terapias como la plasmaféresis. Uno de los síntomas más

comunes asociados a la EM es el dolor neuropático, que se suele tratar con diversos fármacos antidepresivos y/o antiepilépticos orales. Síntomas urinarios derivados de la disfunción vesical que se pueden tratar con fármacos anticolinérgicos, aunque no exentos de efectos adversos a nivel de esfera mental. Otro síntoma común en los pacientes es la fatiga, que se suele tratar con amantadina. El deterioro cognitivo es complejo de abordar y suele focalizarse en evitar los factores que lo contribuyen. Hay otros fármacos que sí son específicos de la EM como la fampridina para el trastorno de la marcha o el cannabidiol para el tratamiento de la espasticidad [19].

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La EM es una enfermedad con base autoinmune que afecta al SNC. Aunque su etiología es todavía desconocida, existen diversos factores de riesgo que se han relacionado con la enfermedad. Uno de ellos es la VD, que ejerce un papel inmunoregulatorio importante sobre el sistema inmune. En la EM, el sistema inmune presenta una disfunción, en la que las diversas células y citoquinas que lo conforman muestran un fenotipo y ejercen acciones más pro-inflamatorias. El papel de TGF- $\beta$  se muestra crucial en la EM, al ser una citoquina capaz de ejercer acciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, y que interviene en los procesos de diferenciación y mantenimiento de las principales células efectoras del sistema inmune. Se ha estudiado con anterioridad el papel de la VD en el sistema inmune y la EM, explorando los mecanismos por los que realiza sus funciones. Se ha encontrado correlación entre la VD y TGF- $\beta$  de diferentes formas, tanto en la EAE como la EM, pero los mecanismos por los que interaccionan no están del todo dilucidados.

Este trabajo es muy destacable porque explora el efecto de la VD sobre la regulación de distintos genes representativos de las principales vías de señalización de TGF- $\beta$ , y además lo hace *in vivo*, en pacientes que están siendo tratados con VD siguiendo la práctica clínica habitual. El poder entender los mecanismos reguladores de la vía de TGF- $\beta$  y la VD podría abrir la posibilidad de encontrar biomarcadores de actividad de la enfermedad y de respuesta terapéutica.



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 Hipótesis**

En pacientes con niveles séricos de vitamina D disminuidos, la suplementación con vitamina D podría disminuir la actividad pro-inflamatoria de la enfermedad vía TGF- $\beta$ .

### **3.2 Objetivos**

#### **3.2.1 Objetivo principal**

Caracterizar la variación de la expresión génica de *SMAD7* y *ERK1*, como representantes de la vía canónica y no canónica de señalización de TGF- $\beta$ , por PCR semicuantitativa como efecto de la suplementación con vitamina D en pacientes con EMRR.

#### **3.2.2 Objetivos secundarios**

1. Caracterizar la variación de la expresión génica de *ZMIZ1*, representante de la vía de proteínas reguladoras PIAS-like de TGF- $\beta$ , por PCR semicuantitativa como efecto de la suplementación con vitamina D en pacientes con EMRR.
2. Caracterizar la variación de la expresión génica de *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7*, como representantes de la familia de BMPs, por PCR semicuantitativa como efecto de la suplementación con vitamina D en pacientes con EMRR.

3. Analizar la correlación entre los niveles séricos de vitamina D y la expresión de los diferentes genes estudiados.
4. Analizar si el mecanismo de acción de los fármacos modificadores de la enfermedad influye en la expresión de los diferentes genes estudiados.
5. Analizar la actividad clínico-radiológica de la enfermedad mediante el Rio-Score (información de brotes, actividad en RM y escala de discapacidad EDSS) y analizar su correlación con la expresión génica de los genes estudiados.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio observacional con medicamentos, unicéntrico, longitudinal y prospectivo en práctica clínica habitual.

### **4.2 Población del estudio**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de EMRR reclutados de forma consecutiva en las consultas de Neurología/enfermedades desmielinizantes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), en Madrid, España y que habían otorgado su consentimiento para participar de manera altruista en el estudio. La información correspondiente a los datos clínicos y radiológicos de la enfermedad se recogió de las historias clínicas, entrevistas y pruebas complementarias. Los pacientes debían cumplir todos los criterios de inclusión del estudio y ninguno de los criterios de exclusión para participar. Los pacientes fueron suplementados con VD (Calcifediol 0,266 mg) a la dosis de 1 ampolla vía oral por mes, siguiendo práctica clínica habitual. Este estudio siguió las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético del HGUGM (234/16).

#### **4.2.1 Criterios de inclusión:**

1. Tener diagnóstico de EMRR según criterios de McDonald 2010 con o sin tratamiento modificador de la enfermedad (DMT).
2. Tener niveles de VD séricos en rango de insuficiencia ( $< 30$  ng/ml), según parámetros de laboratorio de HGUGM.
3. Firmar el consentimiento informado.

#### **4.2.2 Criterios de exclusión:**

1. Haber presentado brotes de la enfermedad en los últimos 30 días.
2. Haber recibido corticoides en los últimos 30 días.
3. Haber presentado cambio de su DMT en el último año.
4. Estar o haber estado con suplementación con VD en los últimos 6 meses.
5. Tener antecedentes de hipersensibilidad a la VD, hiperparatiroidismo, hipercalcemia (Calcio > 10,5 mg/dl), litiasis renal, hipervitaminosis D, raquitismo o insuficiencia renal crónica.

Los brotes se definieron como nuevos síntomas o empeoramiento de síntomas neurológicos preexistentes (ver más adelante punto 4.6), de más de 24 horas de duración, tras un periodo de 30 días de mejoría o estabilidad en ausencia de fiebre o infección.

#### **4.3 Cálculo del tamaño muestral**

Aceptando un riesgo  $\alpha$  de 0,05 y un riesgo  $\beta$  de 0,2 en un contraste bilateral, se calculó que se precisaban 18 sujetos para detectar diferencias de 2 veces. Se asumió que la desviación estándar era de 2 veces. Se estimó una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.

#### **4.4 Plan de visitas**

Se realizaron un total de 4 visitas por paciente:

- *Visita basal:* Durante esta visita se obtuvo el consentimiento informado y se confirmó el cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión del estudio. Posteriormente se extrajeron 18 ml de sangre en dos tubos de EDTA. También

se registró la información de las variables demográficas (edad, sexo, tiempo desde el diagnóstico hasta la recogida de la muestra, DMT, Rio-Score del año previo), y se inició la suplementación con Calcifediol con la posología ya comentada.

- *1º visita de seguimiento*: La segunda visita tuvo lugar al mes del inicio de la suplementación con VD y se volvieron a extraer 18 ml de sangre en dos tubos de EDTA.
- *2º visita de seguimiento*: La tercera visita tuvo lugar a los 6 meses del inicio de la suplementación con VD realizando una nueva extracción de 18 ml de sangre en dos tubos de EDTA.
- *Visita final*: La última visita tuvo lugar al año del inicio de la suplementación con VD y se realizó la medición de la actividad clínico-radiológica de la enfermedad mediante el Rio-Score.

## **4.5 Muestras biológicas**

### **4.5.1 Aislamiento y cultivo de células T CD4+**

Se extrajeron muestras de sangre (18 ml) en dos tubos anticoagulantes con EDTA al inicio del estudio y un mes y seis meses después del inicio de la suplementación con VD. Las muestras se procesaron inmediatamente después de la extracción en condiciones estériles. Las células mononucleares de la sangre periférica se aislaron mediante gradiente de Ficoll como se describe en [145]. Los subtipos de linfocitos T CD4+ se seleccionaron negativamente utilizando el kit DynaBeads® Untouched™ Human CD4 T Cells (Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la selección, las células T CD4+ fueron aisladas en 2 ml de PBS y

contabilizadas en cámara de Neubauer. Posteriormente, fueron centrifugadas a 1200 r.p.m, el sobrenadante se descartó y el pellet de células fue resuspendido y homogenizado en Ribozol (Amresco, Solon, OH, EE.UU.) y finalmente almacenado a -80°C hasta la extracción del RNA.

#### **4.5.2 Aislamiento de RNA y extracción de cDNA**

El RNA de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se aisló utilizando el kit de purificación de RNA Ribozol Plus (Amresco) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue eluido en un volumen total de 50 µl de agua libre de ribonucleasas. La concentración del RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un dispositivo Quawell Q5000 (Quawell Technology), y su integridad se verificó en un dispositivo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando el kit RNA 6000 (Agilent). Todos los RNA tenían un número de integridad de RNA (RIN)  $\geq 8$  y, por tanto, se consideraron aptos para su utilización para la medida de expresión génica por PCR semicuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

#### **4.5.3 qRT-PCR**

Se seleccionaron genes candidatos representativos de las diferentes vías de TGF- $\beta$ . Se seleccionó *SMAD7* como gen regulador de la vía canónica SMAD, *ERK1* como gen representativo de la vía no-SMAD, *ZMIZ1* como gen regulador de la expresión de PIAS, y BMPs como miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ . Seleccionamos *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7* por su mayor expresión en las lesiones de EM evaluadas en estudios anteriores. Los cambios en los genes seleccionados se analizaron en 21 pacientes con EMRR al inicio, un mes y seis meses después de la suplementación con VD. Los DNAs complementarios al RNA (cDNA) se generaron a partir de 500 ng

de RNA utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en 20  $\mu$ L de volumen final incubando la mezcla de reacción a 37°C durante 2 horas, tal y como indica el fabricante. La enzima se inactivó a 85°C durante 15 minutos. La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante qRT-PCR por triplicado con 2  $\mu$ L de cDNA por pocillo (dilución 1/10), 1  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) y 0,04  $\mu$ M de oligonucleótidos específicos para *SMAD7*, *ERK1*, *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP7* y *GAPDH* (**Tabla 5**). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). La expresión relativa de los genes analizados se cuantificó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  con el software StepOnePlus v2.3 (Applied Biosystems). Este método compara el valor de  $C_t$  (ciclo en el que una curva de amplificación coincide con el *threshold* o punto de corte de un gen) del gen que se quiere cuantificar con respecto a un gen control. La diferencia de estos dos  $C_t$  es a lo que se conoce como  $\Delta C_t$ . Posteriormente, para comparar la expresión del gen de estudio en dos muestras se restan los  $\Delta C_t$  para conseguir un  $\Delta\Delta C_t$ . Con el  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  se obtienen valores de expresión relativa entre diferentes muestras en forma equivalente a valores de sobre-expresión y de reducción de la expresión. En este caso se utilizó el gen *GAPDH* para normalizar la expresión.

Secuencias de oligonucleótidos para la qRT-PCR a tiempo real			
Símbolo del gen	Nombre del gen	Sentido	Secuencia
<i>SMAD7</i>	Miembro 7 de la familia SMAD	Forward	ACCCGATGGATTTTCTCAA
		Reverse	AGGGGCCAGATAATTCGTTC
<i>ERK1</i>	Miembro 1 de las quinasas	Forward	CCCTAGCCCAGACAGACATC

	reguladas por señales extracelulares	Reverse	GCACAGTGTCCATTTTCTAACAGT
<b>ZMIZ1</b>	Miembro de la familia de proteínas reguladoras del STAT activado (PIAS-like)	Forward	TTAGAGGGTCAGGCCGGAGC
		Reverse	TCGGGAAGGAGATCCAGCGAA
<b>BMP2</b>	Miembro 2 de la familia BMP	Forward	TCCACCATGAAGAATCTTTG
		Reverse	TAATTCGGTGATGGAAACTG
<b>BMPRII</b>	Receptor tipo II de la familia BMP	Forward	CCCGCTCCTACCTCCT
		Reverse	CGCAGAACAACCGTGAGAG
<b>BMP4</b>	Miembro 4 de la familia BMP	Forward	CTGCAACCGTTCAGAGGTC
		Reverse	TGCTCGGGATGGCACTAC
<b>BMP5</b>	Miembro 5 de la familia BMP	Forward	ATGGCAGGGACTGGATTATAG
		Reverse	AGAGTCTGAACTAGCGTG
<b>BMP7</b>	Miembro 7 de la familia BMP	Forward	TGGTCCACTTCATCAACC
		Reverse	TTCTGTATTTCTTCAGGATGAC
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	Forward	AGCCACATCGCTCAGACAC
		Reverse	GCCCAATACGACCAAATCC

**Tabla 5.** Lista de genes candidatos seleccionados.

## 4.6 Actividad clínico-radiológica

La actividad clínico-radiológica de la enfermedad se midió al inicio y un año después del comienzo de la suplementación mediante el Rio-Score (**Anexo I**), que combina criterios de brote, EDSS y resonancia magnética (RM). El criterio de brote otorgaba un punto si el paciente tenía  $\geq 1$  brote al año. El criterio EDSS puntuaba un

punto si el paciente tenía un aumento de  $\geq 1$  punto en la escala EDSS, mantenido durante al menos seis meses y confirmado al año del estudio. El criterio de RM puntuaba un punto si el paciente tenía  $> 2$  lesiones activas (respecto a una RM anual previa), definidas como lesiones nuevas o que realzan en T2, más el número de lesiones T1 que realzan con gadolinio. El valor de Rio-Score estaba comprendido entre 0 y 3. Un aumento del valor del Rio-Score al año en comparación con el valor inicial se consideraba un deterioro de la puntuación de Rio-Score, mientras que una disminución del valor al año en comparación con el valor inicial se consideraba una mejora en el Rio-Score. Del mismo modo, un aumento de la puntuación de la EDSS (**Anexo II**) al año en comparación con el valor basal se consideró un deterioro de la EDSS, mientras que una disminución de la puntuación al año en comparación con el valor basal se consideró una mejora de la EDSS.

## 4.7 Análisis estadístico

Para el análisis de la expresión génica relativa se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  con StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). La cuantificación relativa se midió con el software Expression Suite v1.3 (Life Technologies). Para los gráficos de expresión se utilizó el programa GraphPad Prism v.8 (Irvine, CA, EE.UU.). Para identificar los genes con expresión diferencial se utilizaron el análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) y una prueba t (t-test, por sus siglas en inglés) pareada. La correlación de Pearson se utilizó para estudiar la asociación entre variables. Un valor  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Las variables de actividad clínico-radiológica se analizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics para Windows, versión 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).



## **5. RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características de los pacientes

Se incluyó en el estudio a un total de 21 pacientes. La mediana de edad de los pacientes fue de 39 (rango intercuartílico (IQR) 11,5; min-max 20-56) años, y la mayoría eran mujeres (76,2%). La mediana de meses desde el diagnóstico de EM hasta la recogida de la muestra era de 95 (IQR 115,3; min-max 15-272). Todos los pacientes estaban con DMT, siendo natalizumab el tratamiento más común. Los niveles séricos de VD aumentaron desde el inicio hasta los seis meses, estando en rango de suficiencia de VD ( $\geq 30$  ng/ml) desde el primer mes del inicio de la suplementación. La mediana de EDSS era de 1,0 (IQR 2,2; min-max 0-6) y se mantuvo estable al año. La mayoría de los pacientes mejoró o mantuvo estable su Rio-Score al año desde el inicio del estudio (Tabla 6).

Características	EMRR (n=21)
Edad, años mediana (IQR; min-max)	39 (11,5; 20–56)
<b>Sexo</b>	
➤ <b>Mujer n, (%)</b>	16 (76,2%)
➤ <b>Varón n, (%)</b>	5 (23,8%)
Meses desde el diagnóstico hasta la recogida de la muestra Mediana (IQR; min-max)	95 (115,3; 15–272)
<b>Tipo de tratamiento modificador de la enfermedad (n) Basal-final</b>	
Interferón beta-1a im	3–3
Acetato de Glatirámero	4–3
Teriflunomida	2–1
Dimetil-fumarato	3–3
Natalizumab	9–10
Alemtuzumab	0–1

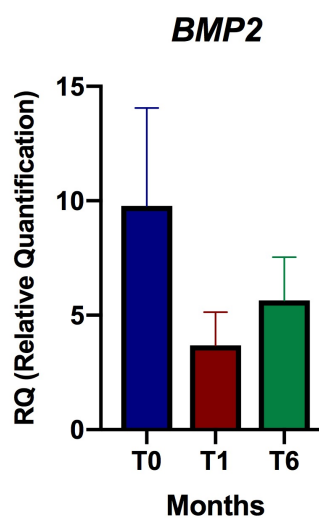
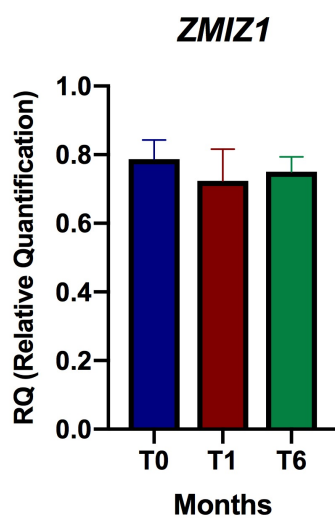
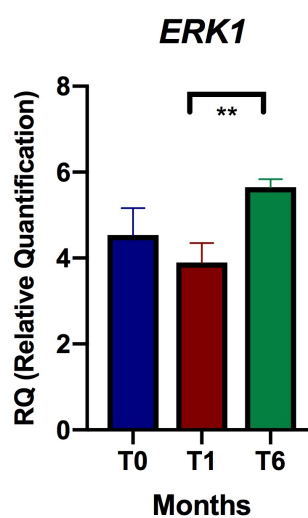
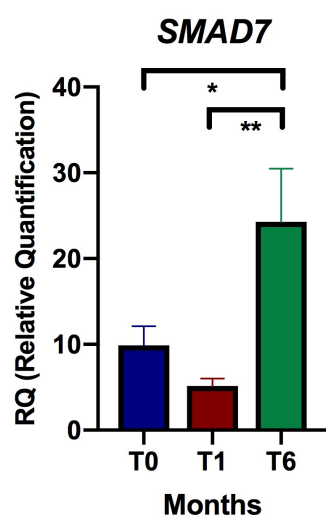
<b>Niveles séricos de vitamina D (ng/ml)</b>	
<b>Mediana; (IQR; min-max)</b>	
<b>T0</b>	24,4; (5,5; 10,1–29,5)
<b>T1</b>	33,8; (11,2; 13,1–80,4)
<b>T6</b>	35,8; (6,9; 17,0–48,0)
<b>EDSS</b>	1,0-1,0; (2,2; 0–6)
<b>Mediana; (IQR, min-max) Basal-final</b>	
<b>Rio-Score <i>n</i>, (%) Basal-final</b>	
<b>0</b>	10 (47,6%)–15 (71,4%)
<b>1</b>	7 (33,3%)–5 (23,8%)
<b>2</b>	2 (14,3%)–1 (4,8%)
<b>3</b>	1 (4,8%)–0 (0%)

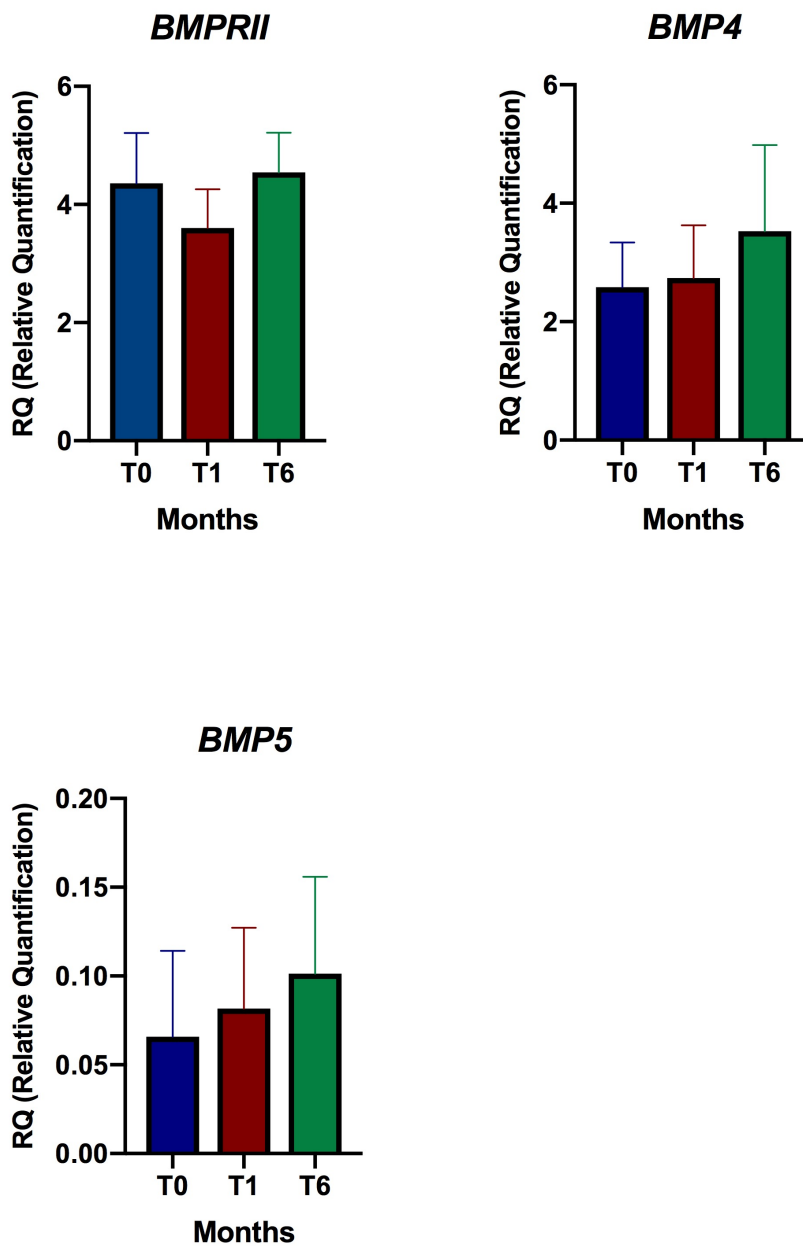
**Tabla 6.** Características de los pacientes. EMRR, esclerosis múltiple-recurrente-remitente; IQR, rango intercuartílico; im, intramuscular; T0, tiempo basal; T1, un mes tras la suplementación; T6, seis meses tras la suplementación; EDSS (por sus siglas en inglés), escala ampliada del estado de discapacidad.

## 5.2 Expresión génica de los genes relacionados con TGF- $\beta$ y su relación con la suplementación con VD

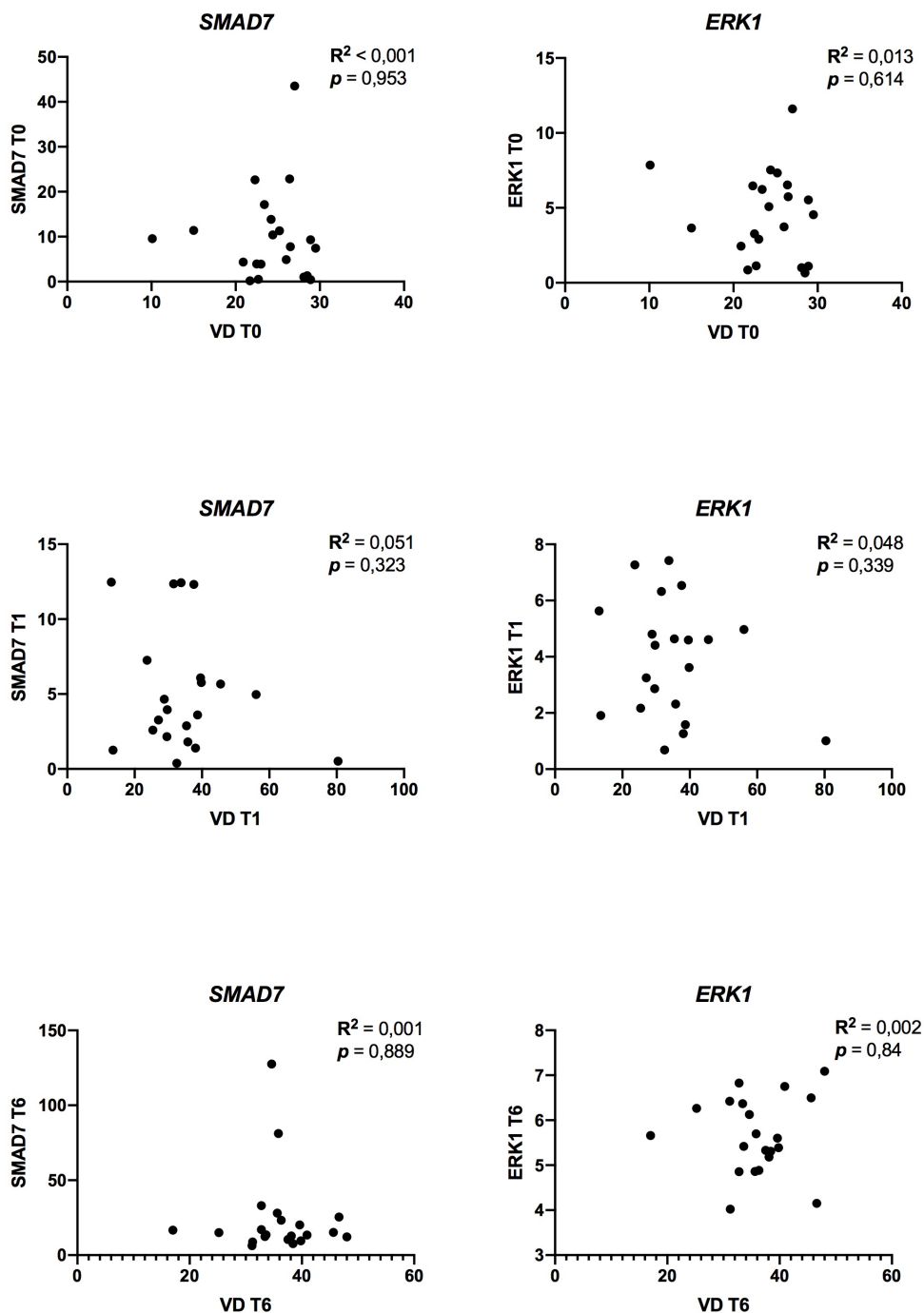
El análisis de la expresión génica relacionada con TGF- $\beta$  reveló que la expresión media del gen *SMAD7* se incrementó 3,66 veces (valor de  $p = 0,033$ ) desde el inicio hasta los seis meses de tratamiento, y 5,32 veces (valor de  $p = 0,008$ ) desde el primer hasta el sexto mes de tratamiento. La expresión media de *SMAD7* en el primer mes fue inferior a la inicial, aunque la diferencia no fue significativa. También se observó un aumento de la expresión media de *ERK1* a los seis meses en comparación con el primer mes de suplementación (1,84 veces; valor de  $p = 0,002$ ). No se encontraron diferencias significativas en la expresión media de *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4* o *BMP5* en los puntos temporales del estudio (**Figura 7**), aunque se observó una tendencia hacia la sobre-expresión de *BMP5* al mes y a los seis meses de suplementación con VD en comparación con el valor basal. *BMP7* no mostró amplificación en la muestra. No se encontró ninguna correlación entre las variables de expresión de los distintos genes del

estudio y los niveles séricos de VD (**Figura 8, 9, 10 y 11**). Los datos de expresión individuales y las variables utilizadas para la comparación en todas las figuras se proporcionan en el Anexo (**Anexo III**).

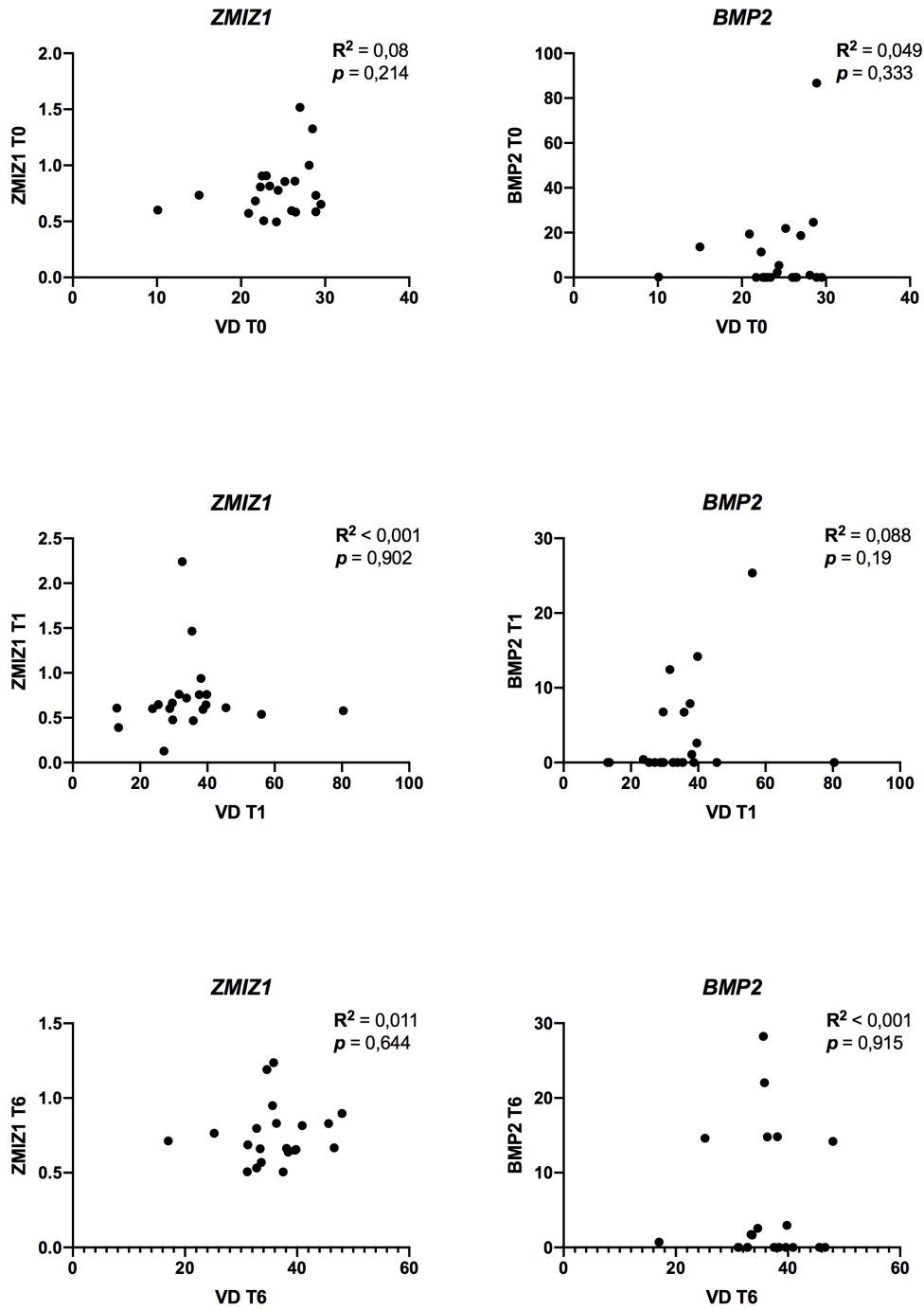




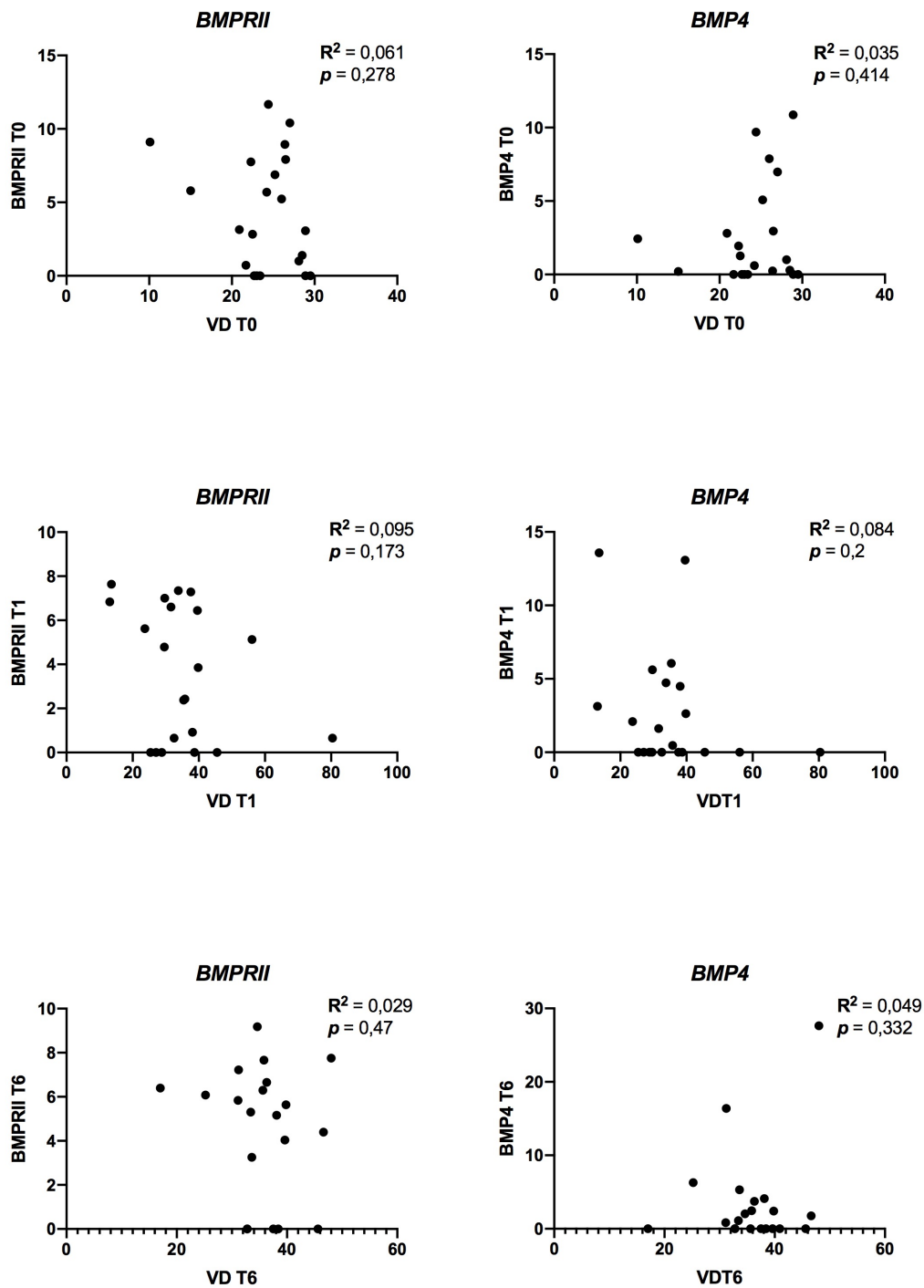
**Figura 7.** Expresión relativa de genes seleccionados en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente al inicio del estudio, tras un mes de suplementación y tras seis meses de suplementación con VD. *SMAD7*; *ERK1*; *ZMIZ1*; *BMP2*; *BMPRII*; *BMP4*; y *BMP5*; T0, tiempo basal; T1, después de un mes de suplementación; T6, después de seis meses de suplementación. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . La cuantificación relativa de la expresión se representa como la media del valor relativo de expresión individual; las barras de error indican el error estándar de la media.



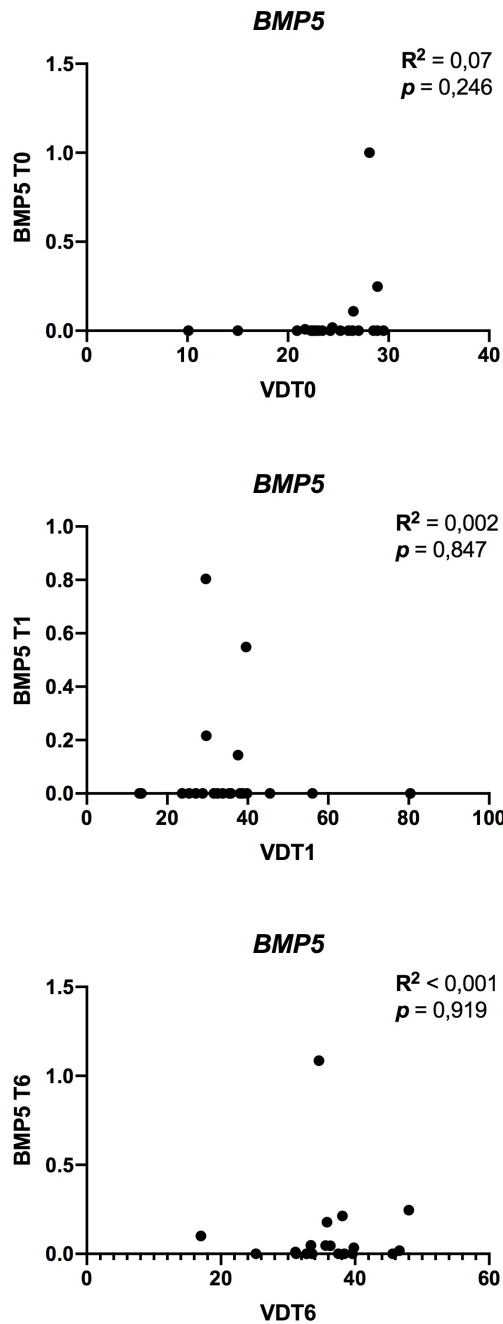
**Figura 8.** Correlación entre los niveles de expresión de *SMAD7* y *ERK1* con los niveles séricos de VD en tiempo basal, un mes y seis meses después de la suplementación con VD. *SMAD7* T0, expresión de *SMAD7* en tiempo basal; *SMAD7* T1, expresión de *SMAD7* un mes tras la suplementación; *SMAD7* T6, expresión de *SMAD7* seis meses tras la suplementación; *ERK1* T0, expresión de *ERK1* en tiempo basal; *ERK1* T1, expresión de *ERK1* un mes tras la suplementación; *ERK1* T6, expresión de *ERK1* seis meses tras la suplementación; VD T0, niveles de VD (ng/ml) en tiempo basal; VD T1, niveles de VD (ng/ml) después de un mes de suplementación; VD T6, niveles de VD (ng/ml) después de seis meses de suplementación;  $R^2$ , grado de correlación;  $p$ , valor de  $p$  de Pearson.



**Figura 9.** Correlación entre los niveles de expresión de *ZMIZ1* y *BMP2* con los niveles séricos de VD en tiempo basal, un mes y seis meses después de la suplementación con VD. *ZMIZ1* T0, expresión de *ZMIZ1* en tiempo basal; *ZMIZ1* T1, expresión de *ZMIZ1* un mes tras la suplementación; *ZMIZ1* T6, expresión de *ZMIZ1* seis meses tras la suplementación; *BMP2* T0, expresión de *BMP2* en tiempo basal; *BMP2* T1, expresión de *BMP2* un mes tras la suplementación; *BMP2* T6, expresión de *BMP2* seis meses tras la suplementación; VD T0, niveles de VD (ng/ml) en tiempo basal; VD T1, niveles de VD (ng/ml) después de un mes de suplementación; VD T6, niveles de VD (ng/ml) después de seis meses de suplementación; R<sup>2</sup>, grado de correlación; p, valor de p de Pearson.



**Figura 10.** Correlación entre los niveles de expresión de *BMPRII* y *BMP4* con los niveles séricos de VD en tiempo basal, un mes y seis meses después de la suplementación con VD. *BMPRII* T0, expresión de *BMPRII* en tiempo basal; *BMPRII* T1, expresión de *BMPRII* un mes tras la suplementación; *BMPRII* T6, expresión de *BMPRII* seis meses tras la suplementación; *BMP4* T0, expresión de *BMP4* en tiempo basal; *BMP4* T1, expresión de *BMP4* un mes tras la suplementación; *BMP4* T6, expresión de *BMP4* seis meses tras la suplementación; VD T0, niveles de VD (ng/ml) en tiempo basal; VD T1, niveles de VD (ng/ml) después de un mes de suplementación; VD T6, niveles de VD (ng/ml) después de seis meses de suplementación;  $R^2$ , grado de correlación;  $p$ , valor de  $p$  de Pearson.

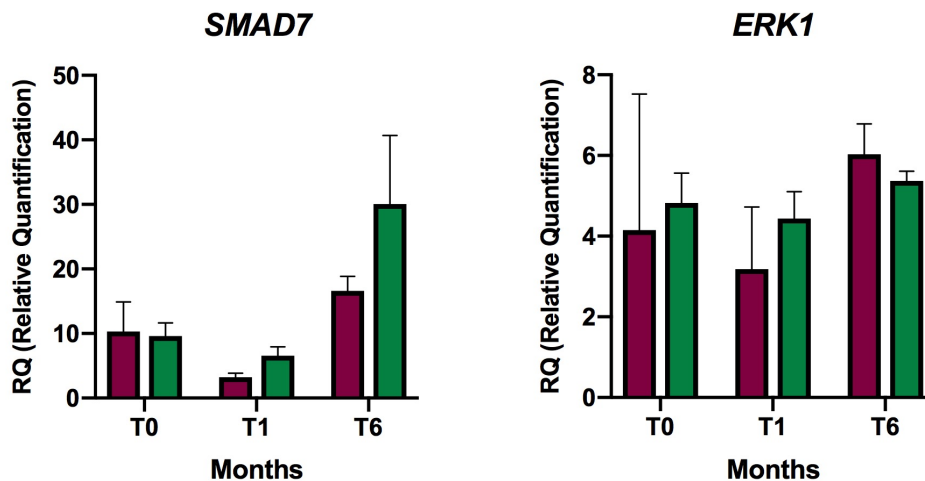


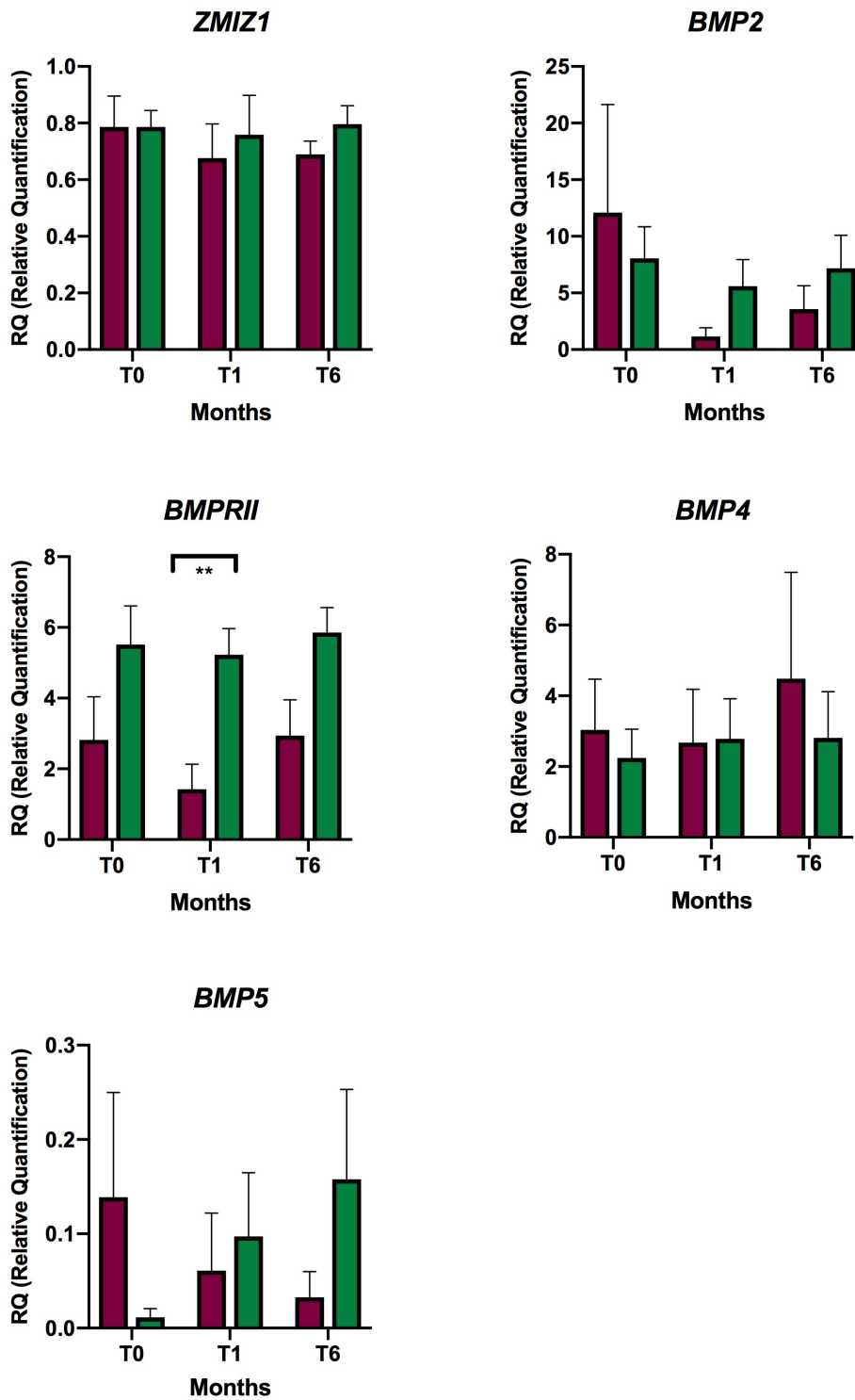
**Figura 11.** Correlación entre los niveles de expresión de *BMP5* con los niveles séricos de VD en tiempo basal, un mes y seis meses después de la suplementación con VD. *BMP5* T0, expresión de *BMP5* en tiempo basal; *BMP5* T1, expresión de *BMP5* un mes tras la suplementación; *BMP5* T6, expresión de *BMP5* seis meses tras la suplementación; VD T0, niveles de VD (ng/ml) en tiempo basal; VD T1, niveles de VD (ng/ml) después de un mes de suplementación; VD T6, niveles de VD (ng/ml) después de seis meses de suplementación;  $R^2$ , grado de correlación;  $p$ , valor de  $p$  de Pearson.

### 5.3 Expresión génica de los genes relacionados con TGF- $\beta$ bajo tratamiento con natalizumab y suplementación con VD

Todos los pacientes reclutados en el estudio se encontraban siendo tratados con DMT. Debido a que natalizumab era el tratamiento principal, se analizaron los cambios medios en la expresión de genes relacionados con TGF- $\beta$ , específicamente en este grupo de pacientes. La comparación reveló que sólo *BMPRII* se expresaba de forma diferencial tras un mes de suplementación con VD. Así, la expresión de *BMPRII* fue 3,66 veces mayor en el grupo no tratado con natalizumab frente al tratado con natalizumab (valor  $p = 0,001$ ) (Tabla 6, Figura 12). Además, se observó una tendencia a una mayor expresión de *BMPRII* en los pacientes no tratados con natalizumab frente a los tratados con natalizumab durante el seguimiento (al inicio, al mes y a los seis meses). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa hasta después de un mes.

Por el contrario, se observó una tendencia a la disminución de la expresión media de *BMP5* desde el inicio hasta los seis meses en los pacientes tratados con natalizumab, mientras que en los pacientes no tratados con natalizumab, la tendencia fue hacia el aumento de la expresión media. No obstante, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.





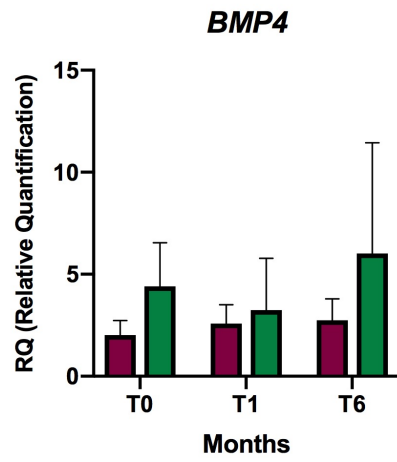
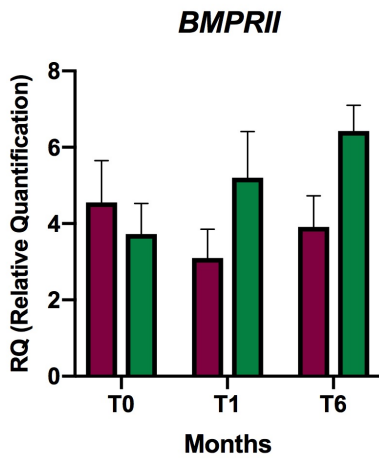
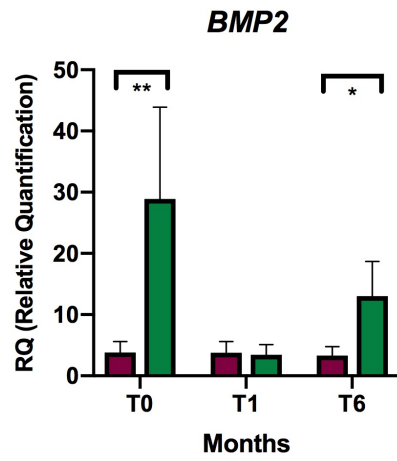
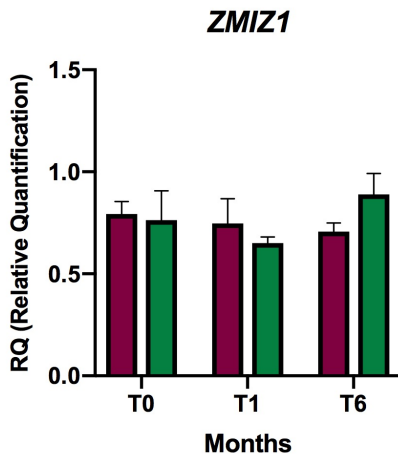
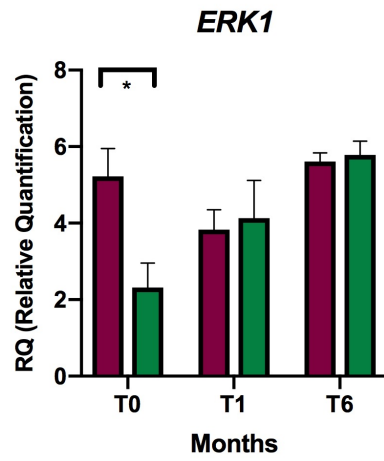
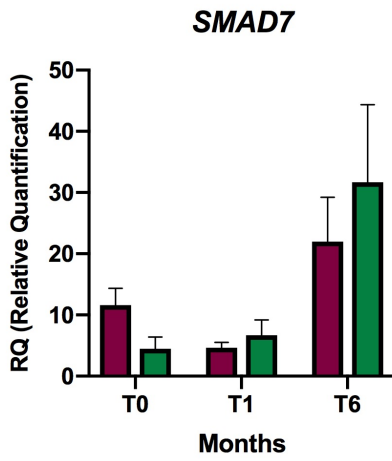
**Figura 12.** Expresión relativa de los genes seleccionados en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente con y sin tratamiento de natalizumab en tiempo basal, un mes y seis meses tras la suplementación con VD. *SMAD7*; *ERK1*; *ZMIZ1*; *BMP2*; *BMPRII*; *BMP4*; y *BMP5*; T0, tiempo basal; T1, después de un mes de suplementación; T6, después de seis meses de suplementación; Rojo, en tratamiento con natalizumab; Verde, sin tratamiento con natalizumab. \*\*  $p < 0,01$ . La cuantificación relativa de la expresión se representa como la media del valor relativo de expresión individual; las barras de error indican el error estándar de la media.

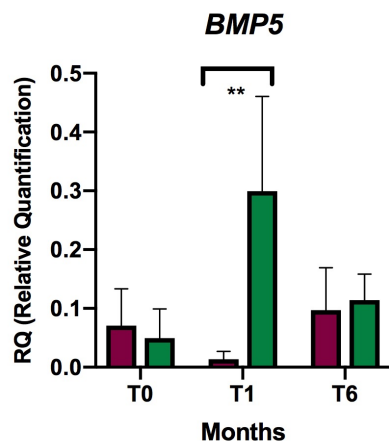
## 5.4 Expresión génica de los genes relacionados con TGF- $\beta$ y actividad clínico-radiológica de la enfermedad

### 5.4.1 Rio-Score

La expresión de genes relacionados con la inflamación podría asociarse con las características clínicas y radiológicas de los pacientes. Por lo tanto, comparamos el grupo de pacientes cuyo Rio-Score mejoró o se mantuvo sin cambios al año del estudio, con aquellos cuyo Rio-Score se deterioró y hallamos una diferencia significativa en la expresión media de *ERK1* en el tiempo basal (expresión 2,25 veces mayor en el grupo de mejora o sin cambios en el Rio-Score; valor de  $p = 0,045$ ). También se hallaron diferencias significativas en la expresión media de *BMP2* en el tiempo basal (expresión 7,44 veces mayor en el grupo de deterioro del Rio-Score; valor de  $p = 0,008$ ) y tras seis meses de suplementación (expresión 3,92 veces mayor en el grupo de deterioro del Rio-Score; valor de  $p = 0,023$ ), y en la expresión media de *BMP5* al mes de suplementación (se observó una expresión 23 veces mayor en el grupo de deterioro del Rio-Score; valor de  $p = 0,004$ ) (**Tabla 6, Figura 13**).

Se observó una tendencia al aumento de la expresión de *BMPRII* tras seis meses de suplementación en el grupo de deterioro, y una tendencia al aumento de la expresión de *SMAD7* en ambos grupos tras seis meses de suplementación. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

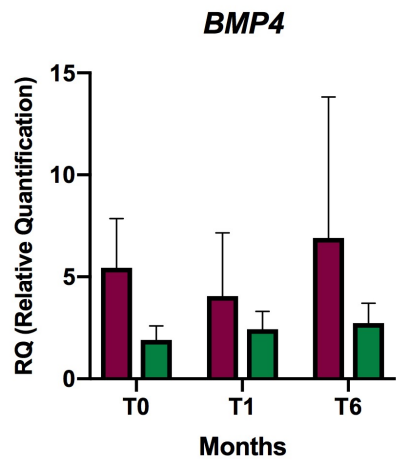
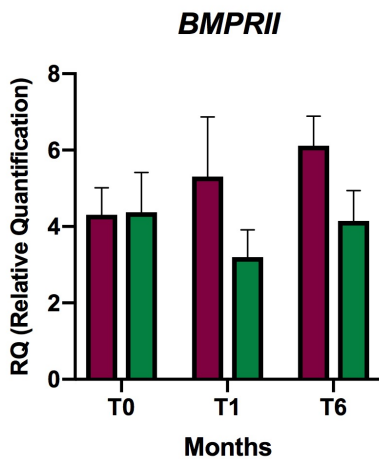
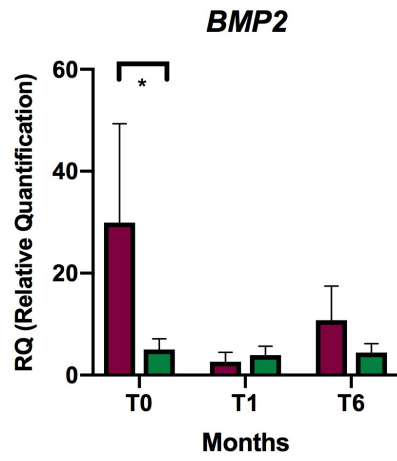
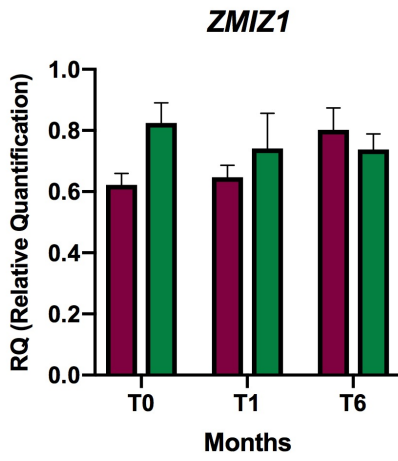
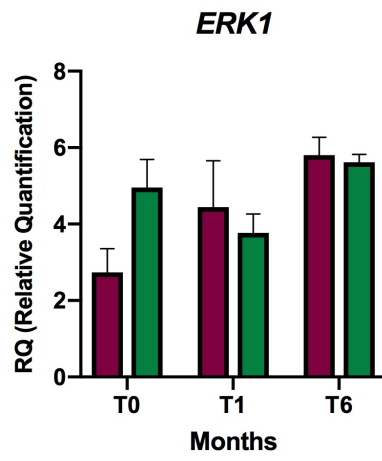
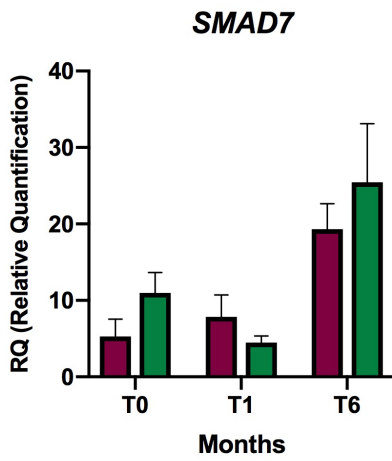


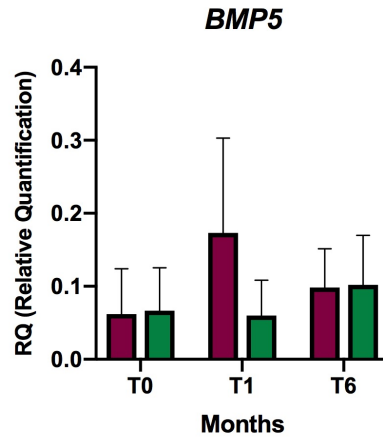


**Figura 13.** Expresión relativa de los genes seleccionados en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente con mejora o sin cambios del Rio-Score versus deterioro del Rio-Score en tiempo basal, un mes y seis meses tras la suplementación con VD. *SMAD7*; *ERK1*; *ZMIZ1*; *BMP2*; *BMPRII*; *BMP4*; y *BMP5*; T0, tiempo basal; T1, después de un mes de suplementación; T6, después de seis meses de suplementación; Rojo, mejora o sin cambios en el Rio-Score; Verde, deterioro del Rio-Score. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . La cuantificación relativa de la expresión se representa como la media del valor relativo de expresión individual; las barras de error indican el error estándar de la media.

#### 5.4.2 Brote

Un total de cuatro pacientes experimentaron un brote durante el estudio. La comparación entre los pacientes que experimentaron brote y los que no lo hicieron mostró una diferencia significativa en la expresión media de *BMP2* en el tiempo basal (5,94 veces en el grupo de brote; valor de  $p = 0,017$ ) (**Figura 14**). También se observó una tendencia al aumento de la expresión de *BMP5* al mes, y de *BMPRII* al mes y a los seis meses del inicio de la suplementación en el grupo de pacientes que experimentaron un brote. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.



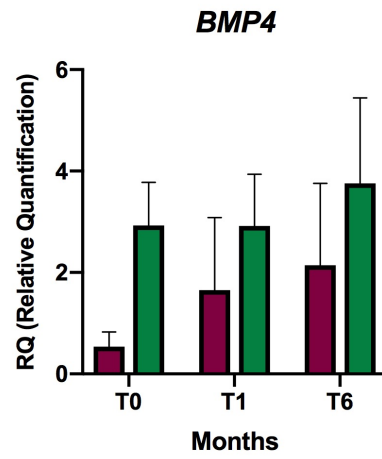
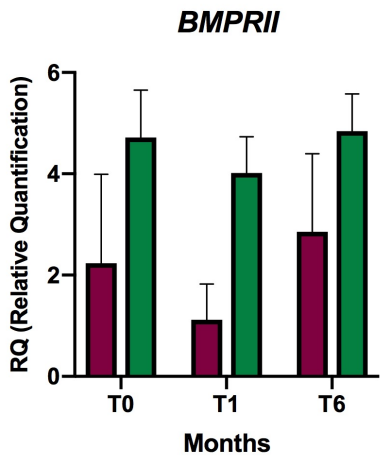
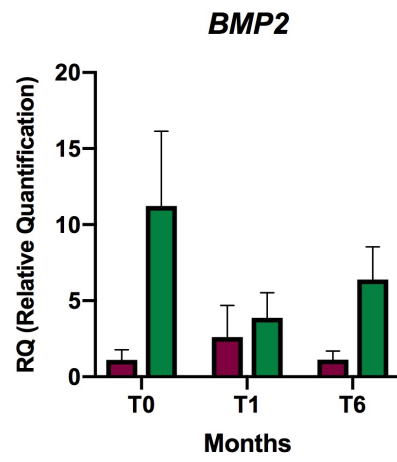
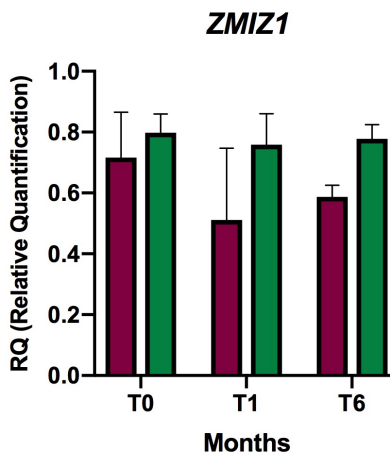
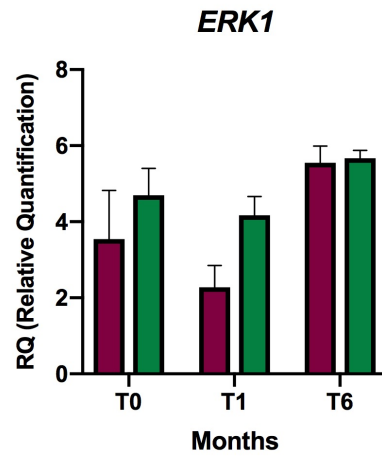
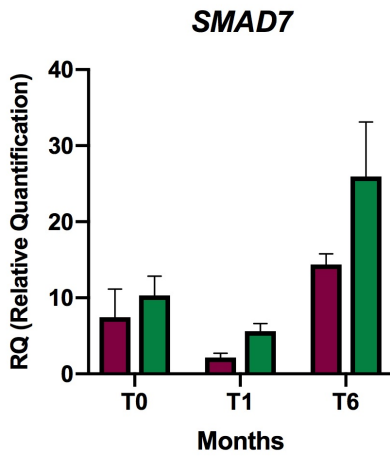


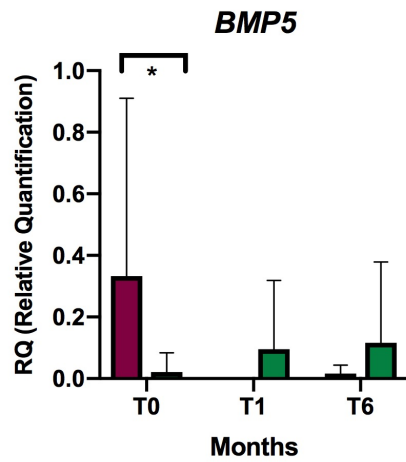
**Figura 14.** Expresión relativa de los genes seleccionados en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente con o sin brotes de la enfermedad en tiempo basal, un mes y seis meses tras la suplementación con VD. *SMAD7*; *ERK1*; *ZMIZ1*; *BMP2*; *BMPRII*; *BMP4*; y *BMP5*; T0, tiempo basal; T1, después de un mes de suplementación; T6, después de seis meses de suplementación; Rojo, brote; Verde, sin brote. \*  $p < 0,05$ . La cuantificación relativa de la expresión se representa como la media del valor relativo de expresión individual; las barras de error indican el error estándar de la media.

### 5.4.3 EDSS

La comparación entre los pacientes cuya EDSS mejoró al año del estudio y aquellos cuya enfermedad empeoró o se mantuvo sin cambios, mostró una diferencia significativa en la expresión media de *BMP5* en el tiempo basal (15,55 veces mayor en el grupo de mejora de la EDSS; valor de  $p = 0,019$ ) (Tabla 6, Figura 15). En cambio, la tendencia de la expresión parece menor al mes y a los seis meses en el grupo de mejora de la EDSS (datos no estadísticamente significativos).

También se observó una tendencia no estadísticamente significativa hacia una mayor expresión de *BMPRII* en el grupo de empeoramiento o sin cambios de la EDSS durante el seguimiento (tiempo basal, un mes y seis meses tras la suplementación).





**Figura 15.** Expresión relativa de los genes seleccionados en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente con mejora en la EDSS versus deterioro o sin cambios en la EDSS en tiempo basal, un mes y seis meses tras la suplementación con VD. *SMAD7*; *ERK1*; *ZMIZ1*; *BMP2*; *BMPRII*; *BMP4*; y *BMP5*; T0, tiempo basal; T1, después de un mes de suplementación; T6, después de seis meses de suplementación; Rojo, mejora en la EDSS; Verde, deterioro o sin cambios en la EDSS. \*  $p < 0,05$ . La cuantificación relativa de la expresión se representa como la media del valor relativo de expresión individual; las barras de error indican el error estándar de la media.



## **6. DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

La EM se considera una enfermedad multifactorial, en la que determinados factores ambientales junto con factores genéticos, ocasionan una disfunción del sistema inmune favoreciendo un efecto pro-inflamatorio sobre el SNC. De los factores ambientales relacionados con la EM, la VD es uno de los más íntimamente relacionados con el desarrollo de la enfermedad [146]. Uno de los principales papeles de la VD en el organismo es intervenir en la homeostasis del calcio y el desarrollo esquelético [147], aunque también desempeña un papel regulador importante sobre el sistema inmune. La evidencia del papel inmuno-regulador de la VD está ampliamente estudiado en diferentes tipos de estudios (*in vitro*, murino, humanos, etc.), y el mecanismo por el que ejerce sus funciones es mediante la regulación de la transcripción de genes diana del sistema inmune. Los efectos derivados de la acción de la VD son múltiples, siendo la mayoría de ellos beneficiosos para la enfermedad, como la menor producción de citoquinas pro-inflamatorias y la mayor producción de citoquinas anti-inflamatorias por parte de las células mieloides, lo que indirectamente influye en una menor diferenciación de células linfoides hacia fenotipos Th1 y Th17, de marcado papel pro-inflamatorio [148,149]. De entre las múltiples citoquinas que se han asociado con el efecto de la VD, se encuentra TGF- $\beta$ , que a su vez constituye una superfamilia de citoquinas y factores de crecimiento que promueven principalmente funciones anti-inflamatorias, como la generación y mantenimiento de células Tregs o la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias [150,151]. Sin embargo, TGF- $\beta$  también es capaz de promover la diferenciación hacia Th17, un fenotipo celular implicado en la patogénesis de la EM y la EAE [152,153]. TGF- $\beta$  por tanto, presenta un papel dual importante en la regulación del sistema inmune. Para llevar a cabo estas funciones, TGF- $\beta$  utiliza diferentes vías de señalización intracelular. Por un lado, está la vía considerada

canónica dependiente de proteínas SMAD, las cuales se activan y se fosforilan en cascada tras la unión de TGF- $\beta$  con su receptor de membrana, formando un complejo que se traslada al núcleo para regular la expresión génica. De entre las proteínas SMAD, existen dos de ellas (SMAD6 y 7), que son inhibitorias y ejercen un mecanismo de retroalimentación sobre la vía canónica. Por otro lado, existen otras vías no dependientes de proteínas SMAD por las que TGF- $\beta$  puede llevar a cabo sus funciones, como las dependientes de MAPK [103,154,155], que a su vez están reguladas a diferentes niveles por diversas proteínas reguladoras.

Por lo tanto, el conocimiento de los cambios provocados por la suplementación con VD en la expresión de genes implicados en esta vía es esencial si queremos entender los efectos moleculares de este tratamiento y establecer futuros biomarcadores de respuesta al mismo.

En este estudio, seleccionamos pacientes con EMRR que presentaban niveles séricos de VD en rango de insuficiencia y se les inició suplementación con VD siguiendo criterios de práctica clínica habitual. Nos propusimos medir los cambios de expresión de diferentes genes representativos de las vías de TGF- $\beta$ , tanto canónica (*SMAD7*) como no canónica (*ERK1*), y de proteínas reguladoras del STAT activado (*ZMIZ1*), así como genes de *BMPs* (*BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7*) como efecto de la suplementación. Para ello se examinaron células T CD4<sup>+</sup> extraídas de sangre periférica de los pacientes, tanto antes como después de la suplementación, para detectar cambios en la expresión de los genes candidatos. Posteriormente se relacionaron los cambios de expresión génica con los principales datos de la actividad clínico-radiológica de la enfermedad en los pacientes.

Encontramos cambios significativos en la expresión de *SMAD7* a los seis meses desde el tiempo basal y desde el primer mes del inicio de la suplementación con VD.

También encontramos diferencias significativas en la expresión de *ERK1* a los seis meses en comparación con el primer mes tras el inicio de la suplementación, lo que indicaría que las vías SMAD y no-SMAD de TGF- $\beta$  podrían estar reguladas por el efecto de la VD. *SMAD7* ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la vía SMAD de TGF- $\beta$  [156,157], mientras que ERK1 forma parte de la vía no-SMAD [99–101]. Estos hallazgos sugieren que es probable que TGF- $\beta$  lleve a cabo sus funciones principalmente a través de la vía no-SMAD, reflejado por el aumento de expresión de *ERK1* que activaría las vías alternativas de señalización intracelular, mientras que la vía SMAD canónica se inhibe debido a la sobre-expresión de *SMAD7* bajo la influencia de VD. En esta línea de resultados, un estudio de EAE en ratones reveló que cuando las células T carecían de TGF- $\beta$ R2, no se diferenciaban a Th17, pero cuando eran tratadas con un inhibidor de la quinasa TGF- $\beta$ R1 (SB-431542) o sobre-expresaban *Smad7*, la población Th17 se mantenía a través de la activación de genes no dependientes de SMAD [105]. Nosotros no encontramos una asociación entre los niveles de VD y la expresión de estos genes, sugiriendo así que VD estaría regulándolos no directamente, sino de una forma más compleja, probablemente actuando sobre otras vías diferentes que indirectamente acaban favoreciendo la sobre-expresión de *SMAD7* y *ERK1*. Se sabe que la VD es capaz de regular la expresión de más de 500 genes en diferentes tejidos *in vivo*, incluyendo la piel, hígado, hueso, sistema inmune, entre otros, por lo que las vías implicadas indirectamente pueden ser muy diversas [158]. En este sentido, otros estudios han demostrado que la VD puede activar vías alternativas no-SMAD de TGF- $\beta$  activando factores de transcripción que se unen al promotor de TGF- $\beta$  o incluso influyendo en su regulación post-transcripcional [116]. Sin embargo, en otro estudio, también en ratones, los autores descubrieron que la forma activa de VD (1,25(OH) $_2$ D3) promovía la expresión de *Smad3* e inhibía la expresión de *Smad7* durante la

diferenciación a Th17 [159]. En humanos con EM suplementados con VD, un estudio encontró diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con la población Th17 y contrariamente a otros estudios en los que la VD se ha asociado con la disminución de la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en células de la microglía, aquí la expresión de IL-6 e IL-17A se veía aumentada con el tratamiento con VD [160]. Otro estudio, también en humanos con EM que recibieron VD, se encontró una mayor expresión de IL-10 pero no de TGF- $\beta$ 1 en los pacientes tratados [161]. Los mecanismos por los que la VD podría aumentar la expresión de IL-10 son diversos, desde un mecanismo directo debido a la existencia de un sitio de unión de VDR en la región proximal promotora del gen de IL-10 [162] o por mecanismos indirectos, por ejemplo la activación de la vía de MAPK (*ERK1/2*) que influyen positivamente en los niveles de IL-10 [163,164]. Nuestros resultados irían precisamente en la línea de este último trabajo, ya que el aumento de expresión de *ERK1* que hemos observado, podría estar favoreciendo las acciones anti-inflamatorias de TGF- $\beta$  en nuestros pacientes bajo la acción de la VD. Además, hay que tener en cuenta que la influencia de la VD en la expresión génica puede cambiar en función del fenotipo celular del sistema inmunitario, como se demostró en otro trabajo en pacientes con EM que fueron suplementados durante seis meses con VD, encontrándose diferentes perfiles de expresión génica en linfocitos T CD4+, monocitos CD14+ y linfocitos B CD19+ [165]. A pesar de las diferencias en los distintos modelos de estudio y entendiendo la enorme complejidad del sistema inmune, aún no está claro el mecanismo por el que la VD regula las diferentes vías de TGF- $\beta$ .

En cuanto al gen *ZMIZ1*, no encontramos diferencias significativas en la expresión de dicho gen bajo la acción de la VD, manteniendo unos niveles de expresión estables a lo largo del estudio. *ZMIZ1* es un miembro de la familia de proteínas

reguladoras similares a la proteína inhibidora del STAT activado (PIAS-like) cuya función se cree que es regular a su vez a otros factores de transcripción, entre ellos TGF- $\beta$ /SMAD [166]. En estudios de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés), se han encontrado diferentes polimorfismos de *ZMIZ1* que se han asociado con diferentes enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM [14,167]. A su vez, en un estudio se ha encontrado que el VDR se une al gen *ZMIZ1* en las células dendríticas inflamatorias [168]. Otro estudio ha encontrado aumento de la expresión de *ZMIZ1* en células dendríticas tolerogénicas e inmaduras y en monocitos bajo tratamiento con VD *in vitro* [107]. Aunque *ZMIZ1* se puede expresar también en otros subtipos celulares del sistema inmune, aparte de monocitos y células dendríticas, no hemos encontrado diferencias de expresión bajo acción de la VD en linfocito T CD4+, lo que puede explicarse por una menor expresión de este gen de base en esta subpoblación inmunitaria y que por tanto no tenga tanta relevancia funcional en el compartimento linfoide.

La población linfoide Th17 facilita la interrupción de la BHE, permitiendo así el tránsito de células inflamatorias al SNC induciendo inflamación crónica [152]. La IL-17A y otras citocinas que responden a Th17 se han detectado en lesiones del SNC tanto en la EM como en la EAE [169], además de que se ha observado que los pacientes con EM tienen una mayor proporción de linfocitos Th17 de entre los linfocitos T CD4+ y mayores niveles séricos de IL-17 e IL-23 en sangre periférica [170]. Sin embargo, existe la dificultad de identificar marcadores de respuesta linfocitaria Th17 en la EM por la escasa accesibilidad al compartimento del SNC [102]. Por lo tanto, investigamos si el mecanismo de acción del DMT del paciente influiría en la expresión génica de TGF- $\beta$ . En nuestro estudio, todos los pacientes estaban recibiendo DMT, nueve de ellos en tratamiento con natalizumab. El natalizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido

contra la cadena  $\alpha$  de la integrina VLA-4 y es un inhibidor muy potente de la migración celular a los tejidos, incluido el SNC. Reduce muy eficazmente los brotes y las lesiones activas en la RM de pacientes con EMRR [171,172]. El resto de DMT de los pacientes presentaban otros mecanismos de acción diferentes, pero en los que el tránsito de células inmunitarias al compartimento del SNC no estaba restringido como en el caso de los pacientes que estaban en tratamiento con natalizumab. Por tanto, podíamos diferenciar dos grupos de pacientes en los que sus compartimentos sanguíneo/SNC podían ser diferentes debido a la interrupción de la migración celular en función del tratamiento que estaban recibiendo. De todos los genes estudiados, sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión de *BMPRII* un mes después del inicio de la suplementación en aquellos pacientes que no recibían natalizumab. Se observó una tendencia a la sobre-expresión de *BMPRII* en los pacientes no tratados con natalizumab en comparación con los pacientes tratados con natalizumab, tanto al inicio como a los seis meses desde la suplementación. Con respecto a *BMP5*, observamos una tendencia decreciente en la expresión media desde el inicio hasta los seis meses en los pacientes tratados con natalizumab frente a una tendencia creciente en los pacientes no tratados con natalizumab. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. El hecho de que exista un bloqueo efectivo de la entrada de células en el SNC en función del tratamiento con natalizumab y, por tanto, compartimentos del SNC aparentemente diferentes, no parece ser determinante en la modificación de la expresión génica de TGF- $\beta$ , excepto en el caso de *BMPRII*. No obstante, no puede excluirse que el mecanismo de acción de los otros DMT afecten a la expresión génica de TGF- $\beta$  en relación con la VD. Este hallazgo estaría en consonancia con otros trabajos, como un estudio en el que los autores midieron la expresión de genes BMP en lesiones de EM y encontraron una mayor expresión de *BMP2*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP7*, *BMPRII* y

*pSMAD1/5/8* en astrocitos, microglía/macrófagos y neuronas [114]. En otro estudio, en este caso en EAE, se observó sobre-expresión de *Bmp4*, *Bmp6* y *Bmp7* en la médula espinal lumbar de ratones con EAE activa [173]. En compartimento de sangre periférica de pacientes con EMRR, también se ha encontrado que la expresión de BMPs se encuentra desregulada y aumentada en células inmunitarias, sobre todo monocitos y linfocitos T, respecto de controles sanos [115]. Otros estudios han puesto de manifiesto que las células inmunes de sangre periférica expresan también antagonistas de la señalización de BMPs, como el noggin y la follistatina, influyendo en la neurogénesis y la oligodendrogénesis que median las BMPs [174,175]. No está claro si hay una relación directa o indirecta en la expresión diferencial de los diferentes actores de BMP/TGF- $\beta$  en los diferentes compartimentos y si la VD influye en ello en función del tratamiento recibido.

Por otro lado quisimos relacionar la expresión génica de TGF- $\beta$  con los datos clínico-radiológicos de la enfermedad y para ello utilizamos el Rio-Score. El Rio-Score es un índice creado a partir de una combinación de datos de lesiones de RM, datos de brote y cambios sostenidos en la EDSS que se diseñó originariamente para evaluar el grado de respuesta terapéutica al interferón-beta en pacientes con EMRR tras un año de tratamiento [176–178]. En nuestro caso, utilizamos el Rio-Score como una medida simple de las características clínico-radiológicas de la enfermedad para evaluar si influirían en la expresión génica en el estudio. Se halló una expresión significativamente mayor de *ERK1* al inicio del estudio, que se normalizó al mes y a los seis meses del inicio de la suplementación en los pacientes cuyo Rio-Score mejoró o se mantuvo sin cambios al año del estudio. La mayor expresión de *ERK1* al inicio sugeriría una mayor activación y participación de la vía no-SMAD de TGF- $\beta$  [104,105], que se normalizó en cuanto los pacientes alcanzaron valores séricos suficientemente elevados de VD tras un

mes de suplementación. Así pues, los efectos anti-inflamatorios de TGF- $\beta$  podrían estar mediados a través de la vía dependiente de la proteína SMAD en este grupo de pacientes. Cabe recordar el efecto dual de TGF- $\beta$  y como esas funciones, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, para llevarlas a cabo, utiliza las mismas vías dependientes o no de proteínas SMAD. Por lo tanto, en una enfermedad crónica como es la EM, en la que existe un binomio entre ambiente pro-inflamatorio y anti-inflamatorio en continuo cambio, la expresión de la vía de TGF- $\beta$  puede significar efectos beneficiosos o perjudiciales para la enfermedad también en continuo cambio. Por otro lado, en el grupo de los pacientes con un empeoramiento del Rio-Score al año, también encontramos que la expresión de *BMP2* fue mayor al inicio y a los seis meses, y la de *BMP5* aumentó al mes, lo que indica que la señalización de BMP también está alterada en este perfil de pacientes con EM [108], aunque su expresión no parece estar relacionada con los niveles de VD y no cambió después de que los niveles séricos volvieran a la normalidad. En la misma línea, también observamos sobre-expresión de *BMP2* basal en los pacientes que presentaron brote de la enfermedad durante el estudio y sobre-expresión de *BMP5* en pacientes cuya EDSS mejoró, lo que refuerza el hecho de la existencia de una desregulación de la señalización de BMP en pacientes con EM. Un estudio halló un aumento de la expresión de *BMP2* en el suero de pacientes con EMRR no tratados, y sus niveles se correlacionaban con los de *BMP4* y *BMP5* [113]. Las BMP son proteínas multifuncionales implicadas en procesos de diferenciación celular, como la astrogliogénesis, la oligodendroglíogénesis y la neurogénesis [179–182]. La señalización por BMP también tiene efectos sobre la diferenciación del sistema inmunitario, facilitando, junto con TGF- $\beta$ , la diferenciación de las células Tregs FOXP3+ [183]. En pacientes con EM, esta desregulación de la señalización BMP

conduce a la proliferación de líneas celulares pro-inflamatorias, promoviendo así la actividad de la enfermedad [115].

Respecto a la suplementación con VD en los pacientes, a día de hoy todavía existe una falta de consenso sobre la dosis o el momento de administración. En este sentido, el *Subcomité de Guías Clínicas de la Sociedad de Endocrinología* define la deficiencia sérica de VD como < 20 ng/mL (50 nmol/L) y la insuficiencia sérica de VD como 21-29 ng/mL (52-72 nmol/L) [184]. Sin embargo, el *Comité de Revisión de Ingestas Dietéticas de Referencia de Vitamina D y Calcio del Instituto de Medicina (EE.UU)*, define la deficiencia de VD como < 12 ng/mL (30 nmol/L) y la insuficiencia de VD como 12-20 ng/mL (30-50 nmol/L) [185]. Existe una relación directa entre la dosis de VD suplementada y la concentración sérica de la misma a modo de línea curva cuando se utilizan dosis diarias de 1000-2000 UI [186]. Se necesitan alrededor de 1040 UI de VD en el caso de la deficiencia y de 400 UI en el caso de la insuficiencia para obtener niveles por encima de 20 ng/mL en la mayoría de los pacientes [187]. No obstante, pueden existir otros factores externos que influyan en la suplementación de la VD y hay numerosos estudios que han intentado establecer la dosis óptima de VD para corregir la deficiencia y la insuficiencia. Las conclusiones de estos estudios eran que al final, independientemente del régimen de dosificación, formulación de la VD, etc., se terminaban alcanzando los niveles adecuados de VD [188–190]. Lo mismo ocurre con el mantenimiento de la suplementación, ya que una vez corregidos los niveles de VD séricos, la *Sociedad de Endocrinología* recomienda una dosis diaria de 600-2000 UI, dependiendo del grado exposición solar que se presente. En este sentido, en nuestro estudio hemos realizado la suplementación con VD según los criterios de práctica clínica habitual en nuestro medio. Así mismo, no hubo abandonos del tratamiento ni efectos adversos relacionados durante todo el período de estudio. Esta observación está

en consonancia con otros estudios publicados, que afirman que la administración de suplementos de VD es segura y tolerable y aporta beneficios inmunológicos a los pacientes con EM [37,191–193]. No obstante, los resultados de otros estudios y ensayos clínicos de suplementación con VD en pacientes con EM no han mostrado resultados concluyentes en muchas ocasiones, como en el caso de Kampman M. et al. [194], que compararon la suplementación semanal con 20.000 UI de VD3 y placebo durante 96 semanas en 68 pacientes con EMRR y EDSS  $\leq$  4.5, no hallando diferencias significativas en la tasa anualizada de brotes ni en la EDSS. En otro estudio, Stein MS. et al. [195] realizaron un ensayo clínico doble ciego durante seis meses con dos brazos de tratamiento (VD2 6000 UI vs VD2 1000 UI), con el objetivo de alcanzar niveles séricos de VD3 de 130-175 nmol/L en pacientes EMRR tratados con interferón beta o acetato de glatirámico, obteniendo resultados negativos en los objetivos primarios de actividad en RM. Actualmente se dispone de datos de dos grandes ensayos clínicos que examinan la suplementación con VD en la EM (SOLAR y CHOLINE). En el estudio SOLAR, se comparó el tratamiento con VD3 (6670 UI que aumentaron a 14.000 UI después de cuatro semanas) con placebo durante 48 semanas en 232 pacientes con EMRR de distintos países europeos. En el caso del estudio CHOLINE, fue un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo y con grupos paralelos en pacientes con EMRR en Francia, en el que se comparó el tratamiento con VD3 (100.000 UI cada dos semanas) frente a placebo durante 96 semanas. Aunque ninguno de los dos estudios alcanzó sus criterios de valoración primarios (ausencia de evidencia de actividad de la enfermedad [NEDA-3] a las 48 semanas en SOLAR y tasa anualizada de brotes a las 96 semanas en CHOLINE), ambos mostraron efectos sobre algunos criterios de valoración secundarios, como una reducción del 32% en las lesiones captantes de gadolinio y reducción de volumen de lesiones T2 en RM en el caso del estudio SOLAR,

y una reducción del número de nuevas lesiones potenciadas en T1 en RM y reducción de progresión de la enfermedad medido por EDSS en el caso del estudio CHOLINE [196–198]. Existen discrepancias entre los estudios observacionales y los ensayos clínicos con VD, lo que podría explicarse de distintas maneras, como un posible reflejo de causalidad inversa, diferencias en el diseño de los criterios de inclusión de los estudios o la potencia para medir los efectos en los objetivos primarios/secundarios, uso de diferentes suplementos de VD con posología y duración variable, el empleo de DMTs, entre otras [199–202]. Aún así, las pruebas seguirían respaldando la recomendación de prescribir suplementos de VD en pacientes con EM con niveles insuficientes de VD [203,204].

Respecto a las limitaciones de nuestro estudio, en primer lugar podría comentarse el habernos limitado exclusivamente a una subpoblación de células inmunes para la medición de la expresión génica, no pudiendo observar si existen cambios de expresión por parte de la VD en otras subpoblaciones inmunitarias, o si la ausencia de expresión de algunos de nuestros genes de TGF- $\beta$  guarda relación con que no se expresen precisamente en el linfocito T CD4+. En este sentido, Munger KL. et al. [205] estudiaron los cambios en la expresión génica global en las células sanguíneas de pacientes con EM que recibieron suplementos de VD, lo que sugiere que la actividad de la EM se ve afectada por una expresión génica desequilibrada relacionada con la VD. Las diferencias con nuestro estudio son que, en primer lugar, nosotros nos centramos en los cambios en la señalización de TGF- $\beta$ , mientras que Munger KL. et al. proporcionaron un perfil transcriptómico completo. En segundo lugar, nosotros medimos la expresión en los linfocitos T CD4+, mientras que Munger KL. et al. utilizaron sangre completa. Y en tercer lugar, los pacientes del estudio de Munger KL. et al. fueron tratados con interferón  $\beta$ -1b mientras que en nuestro estudio los pacientes

estaban en tratamiento con diferentes tipos de DMT. Sin embargo, nuestros resultados también sugieren que la regulación de los genes expresados por la VD puede afectar a la actividad de la EM.

Otra limitación del estudio puede ser la falta de un grupo de control sano para medir los cambios en la expresión génica tras la suplementación con VD. En nuestro estudio, la expresión de *SMAD7* aumentó 3,6 veces en pacientes con EM tras seis meses de suplementación con VD. De forma similar, la expresión de *SMAD7* mostró un aumento de 2,3 veces en donantes sanos en comparación con pacientes con EM en otro estudio anterior de nuestra misma línea de investigación [102]. Aunque el estudio presentado en esta memoria no incorporó un grupo de control sano, nuestros hallazgos sugieren un restablecimiento de los niveles "normales" de *SMAD7* tras seis meses de suplementación con VD [102]. No se dispone de comparaciones para el resto de genes analizados en este estudio.

Sería interesante de cara a futuras investigaciones poder ampliar el número de genes reguladores de la vía de TGF- $\beta$  a medir, además de ampliar a más tipos de células diana del sistema inmune para poder observar efectos más amplios que pueda estar ejerciendo la VD. Por otro lado, también sería interesante implementar mediciones no sólo de expresión génica, sino también de expresión proteica y explorar las vías de regulación post-transcripcional existentes que pudiesen estar implicadas en la vía de TGF- $\beta$ .

## **7. CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

1. El aumento de la expresión de *SMAD7* y *ERK1* a los seis meses tras el inicio de la suplementación sugiere que la VD podría afectar tanto a las vías de señalización SMAD y no-SMAD, que son críticas para el efecto dual de TGF- $\beta$  en el sistema inmune y en la EM.
2. No hemos encontrado diferencias de expresión significativas de *ZMIZ1* en los diferentes tiempos del estudio tras la suplementación con VD, lo que indicaría que la VD no está influyendo de manera determinante en la expresión de *ZMIZ1* en el compartimento linfoide.
3. No encontramos diferencias significativas en la expresión de BMPs (*BMP2*, *BMPRII*, *BMP4* y *BMP5*) en el estudio bajo la influencia de la VD. A pesar de que la señalización de BMP se sabe que esta alterada en los pacientes con EM, no impresiona que esté relacionado con los niveles séricos de VD ni cambien tras su normalización.
4. No se encontró ninguna correlación entre las variables de expresión de los distintos genes del estudio y los niveles séricos de VD. Por lo tanto, la regulación de la VD sobre las vías de TGF- $\beta$  se estaría llevando a cabo de manera indirecta.
5. El bloqueo de la migración celular hacia el SNC bajo el tratamiento con natalizumab no parece ser crucial en la modificación de la expresión génica de TGF- $\beta$ , excepto en el caso de *BMPRII*, que mostró un aumento de expresión significativo después de un mes de la suplementación. Sin embargo, no se puede excluir que el mecanismo de acción de los otros DMT afecten a la expresión génica de TGF- $\beta$  en relación con la VD.

6. Los pacientes que mantuvieron estable o mejoraron su Rio-Score normalizaron los niveles de expresión de *ERK1* basalmente aumentados conforme se normalizaban los niveles séricos de VD.
7. Los pacientes que deterioraron su Rio-Score presentaban una desregulación de la señalización de BMP, presentando un aumento de expresión *BMP2* y *BMP5* tras el inicio de la suplementación, lo que podría traducirse en un incremento de la actividad pro-inflamatoria mediada por BMPs en estos pacientes.
8. Los pacientes que presentaron actividad de la enfermedad en forma de brotes también presentaban un aumento de expresión de *BMP2* basal, lo que sugiere que *BMP2* podría tener un papel importante en los procesos de inflamación y remielinización en la EM.
9. En los pacientes que presentaron mejoría de la EDSS al final del estudio presentaron niveles de expresión aumentados de *BMP5* basal con una tendencia a menor expresión a posteriori, sugiriendo un efecto inmuno-regulador de la señalización de *BMP5*.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hauser, S.L.; Chan, J.R.; Oksenberg, J.R. Multiple Sclerosis: Prospects and Promise. *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 317–327, doi:10.1002/ana.24009.
2. Sospedra, M.; Martin, R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin. Neurol.* **2016**, *36*, 115–127, doi:10.1055/s-0036-1579739.
3. Lassmann, H.; van Horssen, J.; Mahad, D. Progressive Multiple Sclerosis: Pathology and Pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *8*, 647–656, doi:10.1038/nrneurol.2012.168.
4. Trapp, B.D.; Stys, P.K. Virtual Hypoxia and Chronic Necrosis of Demyelinated Axons in Multiple Sclerosis. *Lancet. Neurol.* **2009**, *8*, 280–291, doi:10.1016/S1474-4422(09)70043-2.
5. Pearce, J.M.S. Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. *Eur. Neurol.* **2005**, *54*, 49–53, doi:10.1159/000087387.
6. Kobelt, G.; Thompson, A.; Berg, J.; Gannedahl, M.; Eriksson, J. New Insights into the Burden and Costs of Multiple Sclerosis in Europe. *Mult. Scler.* **2017**, *23*, 1123–1136, doi:10.1177/1352458517694432.
7. Orton, S.-M.; Herrera, B.M.; Yee, I.M.; Valdar, W.; Ramagopalan, S. V.; Sadovnick, A.D.; Ebers, G.C. Sex Ratio of Multiple Sclerosis in Canada: A Longitudinal Study. *Lancet. Neurol.* **2006**, *5*, 932–936, doi:10.1016/S1474-4422(06)70581-6.
8. Lassmann, H.; Brück, W.; Lucchinetti, C. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Pathogenesis: Implications for Diagnosis and Therapy. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 115–121, doi:10.1016/s1471-4914(00)01909-2.
9. Confavreux, C.; Vukusic, S. Natural History of Multiple Sclerosis: A Unifying Concept. *Brain* **2006**, *129*, 606–616, doi:10.1093/brain/awl007.
10. Leray, E.; Yaouanq, J.; Le Page, E.; Coustans, M.; Laplaud, D.; Oger, J.; Edan, G. Evidence for a Two-Stage Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Brain* **2010**, *133*, 1900–1913, doi:10.1093/brain/awq076.
11. Ascherio, A.; Munger, K. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention. *Semin. Neurol.* **2008**, *28*, 17–28, doi:10.1055/s-2007-1019126.
12. Ascherio, A. Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* **2013**, *13*, 3–9, doi:10.1586/14737175.2013.865866.

13. Olsson, T.; Barcellos, L.F.; Alfredsson, L. Interactions between Genetic, Lifestyle and Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 25–36, doi:10.1038/nrneurol.2016.187.
14. Beecham, A.H.; Patsopoulos, N.A.; Xifara, D.K.; Davis, M.F.; Kempainen, A.; Cotsapas, C.; Shah, T.S.; Spencer, C.; Booth, D.; Goris, A.; et al. Analysis of Immune-Related Loci Identifies 48 New Susceptibility Variants for Multiple Sclerosis. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1353–1360, doi:10.1038/ng.2770.
15. Belbasis, L.; Bellou, V.; Evangelou, E.; Ioannidis, J.P.A.; Tzoulaki, I. Environmental Risk Factors and Multiple Sclerosis: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Lancet. Neurol.* **2015**, *14*, 263–273, doi:10.1016/S1474-4422(14)70267-4.
16. Fernández, O.; Fernández, V.; Guerrero, M.; León, A.; López-Madrona, J.C.; Alonso, A.; Bustamante, R.; Tamayo, J.A.; Romero, F.; Bravo, M.; et al. Multiple Sclerosis Prevalence in Malaga, Southern Spain Estimated by the Capture-Recapture Method. *Mult. Scler.* **2012**, *18*, 372–376, doi:10.1177/1352458511421917.
17. Otero-Romero, S.; Ramió-Torrentà, L.; Pericot, I.; Carmona, O.; Perkal, H.; Saiz, A.; Bufill, E.; Robles, R.; Simón, E.; Llufríu, S.; et al. Onset-Adjusted Incidence of Multiple Sclerosis in the Girona Province (Spain): Evidence of Increasing Risk in the South of Europe. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *359*, 146–150, doi:10.1016/j.jns.2015.10.042.
18. Oh, J.; Vidal-Jordana, A.; Montalban, X. Multiple Sclerosis: Clinical Aspects. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *31*, 752–759, doi:10.1097/WCO.0000000000000622.
19. Dobson, R.; Giovannoni, G. Multiple Sclerosis – a Review. *Eur. J. Neurol.* **2019**, *26*, 27–40, doi:10.1111/ene.13819.
20. Ramagopalan, S. V.; Dobson, R.; Meier, U.C.; Giovannoni, G. Multiple Sclerosis: Risk Factors, Prodromes, and Potential Causal Pathways. *Lancet. Neurol.* **2010**, *9*, 727–739, doi:10.1016/S1474-4422(10)70094-6.
21. Dyment, D.A.; Ebers, G.C.; Sadovnick, A.D. Genetics of Multiple Sclerosis. *Lancet. Neurol.* **2004**, *3*, 104–110, doi:10.1016/s1474-4422(03)00663-x.
22. Fontaine, B.; Clerget-Darpoux, F. [Genetic predisposition for multiple sclerosis]. *Pathol. Biol. (Paris)*. **2000**, *48*, 87–92.
23. Harirchian, M.H.; Fatehi, F.; Sarraf, P.; Honarvar, N.M.; Bitarafan, S. Worldwide Prevalence of Familial Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2018**, *20*, 43–47, doi:10.1016/j.msard.2017.12.015.
24. Hollenbach, J.A.; Oksenberg, J.R. The Immunogenetics of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *J. Autoimmun.* **2015**, *64*, 13–25, doi:10.1016/j.jaut.2015.06.010.

25. Lundmark, F.; Duvefelt, K.; Jacobaeus, E.; Kockum, I.; Wallström, E.; Khademi, M.; Oturai, A.; Ryder, L.P.; Saarela, J.; Harbo, H.F.; et al. Variation in Interleukin 7 Receptor Alpha Chain (IL7R) Influences Risk of Multiple Sclerosis. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1108–1113, doi:10.1038/ng2106.
26. Maier, L.M.; Lowe, C.E.; Cooper, J.; Downes, K.; Anderson, D.E.; Severson, C.; Clark, P.M.; Healy, B.; Walker, N.; Aubin, C.; et al. IL2RA Genetic Heterogeneity in Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes Susceptibility and Soluble Interleukin-2 Receptor Production. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000322, doi:10.1371/journal.pgen.1000322.
27. Dean, G.; Yeo, T.W.; Goris, A.; Taylor, C.J.; Goodman, R.S.; Elian, M.; Galea-Debono, A.; Aquilina, A.; Felice, A.; Vella, M.; et al. HLA-DRB1 and Multiple Sclerosis in Malta. *Neurology* **2008**, *70*, 101–105, doi:10.1212/01.wnl.0000284598.98525.d7.
28. Mamedov, A.; Vorobyeva, N.; Filimonova, I.; Zakharova, M.; Kiselev, I.; Bashinskaya, V.; Baulina, N.; Boyko, A.; Favorov, A.; Kulakova, O.; et al. Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1\*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 3088, doi:10.3389/fimmu.2019.03088.
29. Kurtzke, J.F. Epidemiology in Multiple Sclerosis: A Pilgrim's Progress. *Brain* **2013**, *136*, 2904–2917, doi:10.1093/brain/awt220.
30. Koch-Henriksen, N.; Sørensen, P.S. The Changing Demographic Pattern of Multiple Sclerosis Epidemiology. *Lancet. Neurol.* **2010**, *9*, 520–532, doi:10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
31. Sintzel, M.B.; Rametta, M.; Reder, A.T. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol. Ther.* **2018**, *7*, 59–85, doi:10.1007/s40120-017-0086-4.
32. Soilu-Hänninen, M.; Laaksonen, M.; Laitinen, I.; Erälinna, J.-P.; Lilius, E.-M.; Mononen, I. A Longitudinal Study of Serum 25-Hydroxyvitamin D and Intact Parathyroid Hormone Levels Indicate the Importance of Vitamin D and Calcium Homeostasis Regulation in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2008**, *79*, 152–157, doi:10.1136/jnnp.2006.105320.
33. Runia, T.F.; Hop, W.C.J.; de Rijke, Y.B.; Buljevac, D.; Hintzen, R.Q. Lower Serum Vitamin D Levels Are Associated with a Higher Relapse Risk in Multiple Sclerosis. *Neurology* **2012**, *79*, 261–266, doi:10.1212/WNL.0b013e31825fdec7.
34. Ascherio, A.; Munger, K.L.; White, R.; Köchert, K.; Simon, K.C.; Polman, C.H.; Freedman, M.S.; Hartung, H.-P.; Miller, D.H.; Montalbán, X.; et al. Vitamin D as an Early Predictor of Multiple Sclerosis Activity and Progression. *JAMA Neurol.* **2014**, *71*, 306–314, doi:10.1001/jamaneurol.2013.5993.
35. Lucas, R.M.; Gorman, S.; Geldenhuys, S.; Hart, P.H. Vitamin D and Immunity. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, 118, doi:10.12703/P6-118.

36. Smolders, J.; Thewissen, M.; Peelen, E.; Menheere, P.; Tervaert, J.W.C.; Damoiseaux, J.; Hupperts, R. Vitamin D Status Is Positively Correlated with Regulatory T Cell Function in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS One* **2009**, *4*, doi:10.1371/journal.pone.0006635.
37. Sotirchos, E.S.; Bhargava, P.; Eckstein, C.; Van Haren, K.; Baynes, M.; Ntranos, A.; Gocke, A.; Steinman, L.; Mowry, E.M.; Calabresi, P. a. Safety and Immunologic Effects of High-vs Low-Dose Cholecalciferol in Multiple Sclerosis. *Neurology* **2016**, *86*, 382–390, doi:10.1212/WNL.0000000000002316.
38. Yeh, W.Z.; Gresle, M.; Jokubaitis, V.; Stankovich, J.; van der Walt, A.; Butzkueven, H. Immunoregulatory Effects and Therapeutic Potential of Vitamin D in Multiple Sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4113–4133, doi:10.1111/bph.15201.
39. Santón, A.; Cristóbal, E.; Aparicio, M.; Royuela, A.; Villar, L.M.; Alvarez-Cermeño, J.C. High Frequency of Co-Infection by Epstein-Barr Virus Types 1 and 2 in Patients with Multiple Sclerosis. *Mult. Scler.* **2011**, *17*, 1295–1300, doi:10.1177/1352458511411063.
40. Tselis, A. Epstein-Barr Virus Cause of Multiple Sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2012**, *24*, 424–428, doi:10.1097/BOR.0b013e3283542cf8.
41. Haahr, S.; Höllsberg, P. Multiple Sclerosis Is Linked to Epstein-Barr Virus Infection. *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 297–310, doi:10.1002/rmv.503.
42. Lang, H.L.E.; Jacobsen, H.; Ikemizu, S.; Andersson, C.; Harlos, K.; Madsen, L.; Hjorth, P.; Sondergaard, L.; Svejgaard, A.; Wucherpfennig, K.; et al. A Functional and Structural Basis for TCR Cross-Reactivity in Multiple Sclerosis. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 940–943, doi:10.1038/ni835.
43. Tracy, S.I.; Kakalacheva, K.; Lünemann, J.D.; Luzuriaga, K.; Middeldorp, J.; Thorley-Lawson, D.A. Persistence of Epstein-Barr Virus in Self-Reactive Memory B Cells. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12330–12340, doi:10.1128/JVI.01699-12.
44. Pakpoor, J.; Disanto, G.; Gerber, J.E.; Dobson, R.; Meier, U.C.; Giovannoni, G.; Ramagopalan, S. V The Risk of Developing Multiple Sclerosis in Individuals Seronegative for Epstein-Barr Virus: A Meta-Analysis. *Mult. Scler.* **2013**, *19*, 162–166, doi:10.1177/1352458512449682.
45. Leibovitch, E.C.; Jacobson, S. Evidence Linking HHV-6 with Multiple Sclerosis: An Update. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 127–133, doi:10.1016/j.coviro.2014.09.016.
46. Soldan, S.S.; Berti, R.; Salem, N.; Secchiero, P.; Flamand, L.; Calabresi, P.A.; Brennan, M.B.; Maloni, H.W.; McFarland, H.F.; Lin, H.C.; et al. Association of Human Herpes Virus 6 (HHV-6) with Multiple Sclerosis: Increased IgM Response to HHV-6 Early Antigen and Detection of Serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1394–1397, doi:10.1038/nm1297-1394.

47. Tarlinton, R.E.; Martynova, E.; Rizvanov, A.A.; Khaiboullina, S.; Verma, S. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/v12060643.
48. Hedström, A.K.; Olsson, T.; Alfredsson, L. Smoking Is a Major Preventable Risk Factor for Multiple Sclerosis. *Mult. Scler.* **2016**, *22*, 1021–1026, doi:10.1177/1352458515609794.
49. Hedström, A.K.; Bomfim, I.L.; Barcellos, L.F.; Briggs, F.; Schaefer, C.; Kockum, I.; Olsson, T.; Alfredsson, L. Interaction between Passive Smoking and Two HLA Genes with Regard to Multiple Sclerosis Risk. *Int. J. Epidemiol.* **2014**, *43*, 1791–1798, doi:10.1093/ije/dyu195.
50. Hernán, M.A.; Jick, S.S.; Logroscino, G.; Olek, M.J.; Ascherio, A.; Jick, H. Cigarette Smoking and the Progression of Multiple Sclerosis. *Brain* **2005**, *128*, 1461–1465, doi:10.1093/brain/awh471.
51. Correale, J.; Marrodan, M. Multiple Sclerosis and Obesity: The Role of Adipokines. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1038393, doi:10.3389/fimmu.2022.1038393.
52. Katz Sand, I. The Role of Diet in Multiple Sclerosis: Mechanistic Connections and Current Evidence. *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7*, 150–160, doi:10.1007/s13668-018-0236-z.
53. Nourbakhsh, B.; Graves, J.; Casper, T.C.; Lulu, S.; Waldman, A.; Belman, A.; Greenberg, B.; Weinstock-Guttman, B.; Aaen, G.; Tillema, J.-M.; et al. Dietary Salt Intake and Time to Relapse in Paediatric Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2016**, *87*, 1350–1353, doi:10.1136/jnnp-2016-313410.
54. Correale, J.; Hohlfeld, R.; Baranzini, S.E. The Role of the Gut Microbiota in Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **2022**, *18*, 544–558, doi:10.1038/s41582-022-00697-8.
55. Liu, R.; Du, S.; Zhao, L.; Jain, S.; Sahay, K.; Rizvanov, A.; Lezhnyova, V.; Khaibullin, T.; Martynova, E.; Khaiboullina, S.; et al. Autoreactive Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment Target. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 996469, doi:10.3389/fimmu.2022.996469.
56. Ahmed, S.M.; Fransen, N.L.; Touil, H.; Michailidou, I.; Huitinga, I.; Gommerman, J.L.; Bar-Or, A.; Ramaglia, V. Accumulation of Meningeal Lymphocytes Correlates with White Matter Lesion Activity in Progressive Multiple Sclerosis. *JCI insight* **2022**, *7*, doi:10.1172/jci.insight.151683.
57. Ramaglia, V.; Sheikh-Mohamed, S.; Legg, K.; Park, C.; Rojas, O.L.; Zandee, S.; Fu, F.; Ornatsky, O.; Swanson, E.C.; Pitt, D.; et al. Multiplexed Imaging of Immune Cells in Staged Multiple Sclerosis Lesions by Mass Cytometry. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.48051.

58. Verma, N.D.; Lam, A.D.; Chiu, C.; Tran, G.T.; Hall, B.M.; Hodgkinson, S.J. Multiple Sclerosis Patients Have Reduced Resting and Increased Activated CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)T Regulatory Cells. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 10476, doi:10.1038/s41598-021-88448-5.
59. Rodi, M.; Dimisianos, N.; de Lastic, A.-L.; Sakellaraki, P.; Deraos, G.; Matsoukas, J.; Papathanasopoulos, P.; Mouzaki, A. Regulatory Cell Populations in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) Patients: Effect of Disease Activity and Treatment Regimens. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17091398.
60. Hedegaard, C.J.; Chen, N.; Sellebjerg, F.; Sørensen, P.S.; Leslie, R.G.Q.; Bendtzen, K.; Nielsen, C.H. Autoantibodies to Myelin Basic Protein (MBP) in Healthy Individuals and in Patients with Multiple Sclerosis: A Role in Regulating Cytokine Responses to MBP. *Immunology* **2009**, *128*, e451–e461, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02999.x.
61. Vanderlugt, C.L.; Miller, S.D. Epitope Spreading in Immune-Mediated Diseases: Implications for Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 85–95, doi:10.1038/nri724.
62. McMahon, E.J.; Bailey, S.L.; Castenada, C.V.; Waldner, H.; Miller, S.D. Epitope Spreading Initiates in the CNS in Two Mouse Models of Multiple Sclerosis. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 335–339, doi:10.1038/nm1202.
63. O’Garra, A.; Murphy, K.M. From IL-10 to IL-12: How Pathogens and Their Products Stimulate APCs to Induce T(H)1 Development. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 929–932, doi:10.1038/ni0909-929.
64. Szabo, S.J.; Sullivan, B.M.; Peng, S.L.; Glimcher, L.H. Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 713–758, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942.
65. Miossec, P.; Kolls, J.K. Targeting IL-17 and TH17 Cells in Chronic Inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 763–776, doi:10.1038/nrd3794.
66. Miossec, P.; Korn, T.; Kuchroo, V.K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 888–898, doi:10.1056/NEJMra0707449.
67. Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 485–517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
68. Perumal, N.B.; Kaplan, M.H. Regulating Il9 Transcription in T Helper Cells. *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 146–150, doi:10.1016/j.it.2011.01.006.
69. Arneth, B. Contributions of T Cells in Multiple Sclerosis: What Do We Currently Know? *J. Neurol.* **2021**, *268*, 4587–4593, doi:10.1007/s00415-020-10275-x.

70. Panitch, H.S.; Hirsch, R.L.; Haley, A.S.; Johnson, K.P. Exacerbations of Multiple Sclerosis in Patients Treated with Gamma Interferon. *Lancet (London, England)* **1987**, *1*, 893–895, doi:10.1016/s0140-6736(87)92863-7.
71. Panitch, H.S.; Hirsch, R.L.; Schindler, J.; Johnson, K.P. Treatment of Multiple Sclerosis with Gamma Interferon: Exacerbations Associated with Activation of the Immune System. *Neurology* **1987**, *37*, 1097–1102, doi:10.1212/wnl.37.7.1097.
72. Elyaman, W.; Khoury, S.J. Th9 Cells in the Pathogenesis of EAE and Multiple Sclerosis. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 79–87, doi:10.1007/s00281-016-0604-y.
73. El-Behi, M.; Ciric, B.; Dai, H.; Yan, Y.; Cullimore, M.; Safavi, F.; Zhang, G.-X.; Dittel, B.N.; Rostami, A. The Encephalitogenicity of T(H)17 Cells Is Dependent on IL-1- and IL-23-Induced Production of the Cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 568–575, doi:10.1038/ni.2031.
74. Starost, L.; Lindner, M.; Herold, M.; Xu, Y.K.T.; Drexler, H.C.A.; Heß, K.; Ehrlich, M.; Ottoboni, L.; Ruffini, F.; Stehling, M.; et al. Extrinsic Immune Cell-Derived, but Not Intrinsic Oligodendroglial Factors Contribute to Oligodendroglial Differentiation Block in Multiple Sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2020**, *140*, 715–736, doi:10.1007/s00401-020-02217-8.
75. Babbe, H.; Roers, A.; Waisman, A.; Lassmann, H.; Goebels, N.; Hohlfeld, R.; Friese, M.; Schröder, R.; Deckert, M.; Schmidt, S.; et al. Clonal Expansions of CD8(+) T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 393–404, doi:10.1084/jem.192.3.393.
76. Bitsch, A.; Schuchardt, J.; Bunkowski, S.; Kuhlmann, T.; Brück, W. Acute Axonal Injury in Multiple Sclerosis. Correlation with Demyelination and Inflammation. *Brain* **2000**, *123* (Pt 6), 1174–1183, doi:10.1093/brain/123.6.1174.
77. Giuliani, F.; Goodyer, C.G.; Antel, J.P.; Yong, V.W. Vulnerability of Human Neurons to T Cell-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 368–379, doi:10.4049/jimmunol.171.1.368.
78. Medana, I.M.; Gallimore, A.; Oxenius, A.; Martinic, M.M.; Wekerle, H.; Neumann, H. MHC Class I-Restricted Killing of Neurons by Virus-Specific CD8+ T Lymphocytes Is Effected through the Fas/FasL, but Not the Perforin Pathway. *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 3623–3633, doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3623::AID-IMMU3623>3.0.CO;2-F.
79. Bar-Or, A.; O'Brien, S.M.; Sweeney, M.L.; Fox, E.J.; Cohen, J.A. Clinical Perspectives on the Molecular and Pharmacological Attributes of Anti-CD20 Therapies for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2021**, *35*, 985–997, doi:10.1007/s40263-021-00843-8.

80. Bar-Or, A.; Fawaz, L.; Fan, B.; Darlington, P.J.; Rieger, A.; Ghorayeb, C.; Calabresi, P.A.; Waubant, E.; Hauser, S.L.; Zhang, J.; et al. Abnormal B-Cell Cytokine Responses a Trigger of T-Cell-Mediated Disease in MS? *Ann. Neurol.* **2010**, *67*, 452–461, doi:10.1002/ana.21939.
81. Comi, G.; Bar-Or, A.; Lassmann, H.; Uccelli, A.; Hartung, H.-P.; Montalban, X.; Sørensen, P.S.; Hohlfeld, R.; Hauser, S.L. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* **2021**, *89*, 13–23, doi:10.1002/ana.25927.
82. Negron, A.; Stüve, O.; Forsthuber, T.G. Ectopic Lymphoid Follicles in Multiple Sclerosis: Centers for Disease Control? *Front. Neurol.* **2020**, *11*, 607766, doi:10.3389/fneur.2020.607766.
83. Lundqvist, S.; Modvig, S.; Fischer, E.A.; Frederiksen, J.L.; Degn, M. Frequency and Immunophenotype of IL10-Producing Regulatory B Cells in Optic Neuritis. *Immunology* **2019**, *156*, 259–269, doi:10.1111/imm.13024.
84. Ran, Z.; Yue-Bei, L.; Qiu-Ming, Z.; Huan, Y. Regulatory B Cells and Its Role in Central Nervous System Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1884, doi:10.3389/fimmu.2020.01884.
85. Carter, N.A.; Vasconcellos, R.; Rosser, E.C.; Tulone, C.; Muñoz-Suano, A.; Kamanaka, M.; Ehrenstein, M.R.; Flavell, R.A.; Mauri, C. Mice Lacking Endogenous IL-10-Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 5569–5579, doi:10.4049/jimmunol.1100284.
86. Mexhitaj, I.; Nyirenda, M.H.; Li, R.; O’Mahony, J.; Rezk, A.; Rozenberg, A.; Moore, C.S.; Johnson, T.; Sadovnick, D.; Collins, D.L.; et al. Abnormal Effector and Regulatory T Cell Subsets in Paediatric-Onset Multiple Sclerosis. *Brain* **2019**, *142*, 617–632, doi:10.1093/brain/awz017.
87. Bar-Or, A.; Li, R. Cellular Immunology of Relapsing Multiple Sclerosis: Interactions, Checks, and Balances. *Lancet. Neurol.* **2021**, *20*, 470–483, doi:10.1016/S1474-4422(21)00063-6.
88. Danikowski, K.M.; Jayaraman, S.; Prabhakar, B.S. Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis and Myasthenia Gravis. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 117, doi:10.1186/s12974-017-0892-8.
89. Calahorra, L.; Camacho-Toledano, C.; Serrano-Regal, M.P.; Ortega, M.C.; Clemente, D. Regulatory Cells in Multiple Sclerosis: From Blood to Brain. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:10.3390/biomedicines10020335.
90. Goldmann, T.; Prinz, M. Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 208093, doi:10.1155/2013/208093.

91. Mantovani, A.; Biswas, S.K.; Galdiero, M.R.; Sica, A.; Locati, M. Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 176–185, doi:10.1002/path.4133.
92. Voet, S.; Prinz, M.; van Loo, G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 112–123, doi:10.1016/j.molmed.2018.11.005.
93. Singh, S.; Metz, I.; Amor, S.; van der Valk, P.; Stadelmann, C.; Brück, W. Microglial Nodules in Early Multiple Sclerosis White Matter Are Associated with Degenerating Axons. *Acta Neuropathol.* **2013**, *125*, 595–608, doi:10.1007/s00401-013-1082-0.
94. Hanisch, U.-K. Microglia as a Source and Target of Cytokines. *Glia* **2002**, *40*, 140–155, doi:10.1002/glia.10161.
95. Colonna, M.; Butovsky, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* **2017**, *35*, 441–468, doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
96. Takeuchi, H.; Jin, S.; Wang, J.; Zhang, G.; Kawanokuchi, J.; Kuno, R.; Sonobe, Y.; Mizuno, T.; Suzumura, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Neurotoxicity via Glutamate Release from Hemichannels of Activated Microglia in an Autocrine Manner. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21362–21368, doi:10.1074/jbc.M600504200.
97. Bai, Z.; Chen, D.; Wang, L.; Zhao, Y.; Liu, T.; Yu, Y.; Yan, T.; Cheng, Y. Cerebrospinal Fluid and Blood Cytokines as Biomarkers for Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 226 Studies With 13,526 Multiple Sclerosis Patients. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1026.
98. Ottum, P.A.; Arellano, G.; Reyes, L.I.; Iruretagoyena, M.; Naves, R. Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 539, doi:10.3389/fimmu.2015.00539.
99. Kamato, D.; Burch, M.L.; Piva, T.J.; Rezaei, H.B.; Rostam, M.A.; Xu, S.; Zheng, W.; Little, P.J.; Osman, N. Transforming Growth Factor-B Signalling: Role and Consequences of Smad Linker Region Phosphorylation. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2017–2024, doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.001.
100. Heldin, C.H.; Moustakas, A. Role of Smads in TGF $\beta$  Signaling. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 21–36, doi:10.1007/s00441-011-1190-x.
101. Meoli, E.M.; Oh, U.; Grant, C.W.; Jacobson, S. TGF-B Signaling Is Altered in the Peripheral Blood of Subjects with Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *230*, 164–168, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.10.028.
102. Abarca-Zabalía, J.; García, M.I.; Ros, A.L.; Marín-Jiménez, I.; Martínez-Ginés, M.L.; López-Cauce, B.; Martín-Barbero, M.L.; Salvador-Martín, S.; Sanjurjo-

- Saez, M.; García-Domínguez, J.M.; et al. Differential Expression of SMAD Genes and S1PR1 on Circulating cd4+ T Cells in Multiple Sclerosis and Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–14, doi:10.3390/ijms21020676.
103. Mirshafiey, A.; Mohsenzadegan, M. TGF-B as a Promising Option in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 929–936, doi:10.1016/j.neuropharm.2009.02.007.
  104. Moustakas, A.; Heldin, C.-H. Non-Smad TGF-Beta Signals. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3573–3584, doi:10.1242/jcs.02554.
  105. Hasan, M.; Neumann, B.; Haupeltshofer, S.; Stahlke, S.; Claudio Fantini, M.; Angstwurm, K.; Bogdahn, U.; Kleiter, I. Activation of TGF-B-Induced Non-Smad Signaling Pathways during Th17 Differentiation. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 662–672, doi:10.1038/icb.2015.21.
  106. Li, X.; Thyssen, G.; Beliakoff, J.; Sun, Z. The Novel PIAS-like Protein hZimp10 Enhances Smad Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23748–23756, doi:10.1074/jbc.M508365200.
  107. Fewings, N.L.; Gatt, P.N.; McKay, F.C.; Parnell, G.P.; Schibeci, S.D.; Edwards, J.; Basuki, M. a.; Goldinger, a.; Fabis-Pedrini, M.J.; Kermode, a. G.; et al. The Autoimmune Risk Gene ZMIZ1 Is a Vitamin D Responsive Marker of a Molecular Phenotype of Multiple Sclerosis. *J. Autoimmun.* **2017**, *78*, 57–69, doi:10.1016/j.jaut.2016.12.006.
  108. Eixarch, H.; Calvo-Barreiro, L.; Montalban, X.; Espejo, C. Bone Morphogenetic Proteins in Multiple Sclerosis: Role in Neuroinflammation. *Brain. Behav. Immun.* **2018**, *68*, 1–10, doi:10.1016/j.bbi.2017.02.019.
  109. Sotiropoulos, M.G.; Chitnis, T. Opposing and Potentially Antagonistic Effects of BMP and TGF-B in Multiple Sclerosis: The “Yin and Yang” of Neuro-Immune Signaling. *J. Neuroimmunol.* **2020**, *347*, 577358, doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577358.
  110. Mueller, T.D. Mechanisms of BMP-Receptor Interaction and Activation. *Vitam. Horm.* **2015**, *99*, 1–61, doi:10.1016/bs.vh.2015.06.003.
  111. Mausner-Fainberg, K.; Benhamou, M.; Golan, M.; Kimelman, N.B.; Danon, U.; Marom, E.; Karni, A. Specific Blockade of Bone Morphogenetic Protein-2/4 Induces Oligodendrogenesis and Remyelination in Demyelinating Disorders. *Neurotherapeutics* **2021**, *18*, 1798–1814, doi:10.1007/s13311-021-01068-9.
  112. Voumvourakis, K.I.; Antonelou, R.C.; Kitsos, D.K.; Stamboulis, E.; Tsiodras, S. TGF-β/BMPs: Crucial Crossroad in Neural Autoimmune Disorders. *Neurochem. Int.* **2011**, *59*, 542–550, doi:10.1016/j.neuint.2011.06.004.
  113. Penn, M.; Mausner-Fainberg, K.; Golan, M.; Karni, A. High Serum Levels of BMP-2 Correlate with BMP-4 and BMP-5 Levels and Induce Reduced Neuronal

- Phenotype in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2017**, *310*, 120–128, doi:10.1016/j.jneuroim.2017.07.008.
114. Costa, C.; Eixarch, H.; Martínez-Sáez, E.; Calvo-Barreiro, L.; Calucho, M.; Castro, Z.; Ortega-Aznar, A.; Ramón y Cajal, S.; Montalban, X.; Espejo, C. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Multiple Sclerosis Lesions. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 665–676, doi:10.1016/j.ajpath.2018.11.007.
  115. Mausner-Fainberg, K.; Urshansky, N.; Regev, K.; Auriel, E.; Karni, A. Elevated and Dysregulated Bone Morphogenetic Proteins in Immune Cells of Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *264*, 91–99, doi:10.1016/j.jneuroim.2013.09.004.
  116. Shirvani-Farsani, Z.; Behmanesh, M.; Mohammadi, S.M.; Moghadasi, A.N. Vitamin D Levels in Multiple Sclerosis Patients: Association with TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ RI, and TGF- $\beta$ RII Expression. *Life Sci.* **2015**, *134*, 63–67, doi:10.1016/j.lfs.2015.05.017.
  117. Lublin, F.D.; Reingold, S.C. Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: Results of an International Survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* **1996**, *46*, 907–911, doi:10.1212/wnl.46.4.907.
  118. Lublin, F.D. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *Eur. Neurol.* **2014**, *72 Suppl 1*, 1–5, doi:10.1159/000367614.
  119. Solomon, A.J.; Naismith, R.T.; Cross, A.H. Misdiagnosis of Multiple Sclerosis: Impact of the 2017 McDonald Criteria on Clinical Practice. *Neurology* **2019**, *92*, 26–33, doi:10.1212/WNL.0000000000006583.
  120. Brownlee, W.J.; Hardy, T.A.; Fazekas, F.; Miller, D.H. Diagnosis of Multiple Sclerosis: Progress and Challenges. *Lancet (London, England)* **2017**, *389*, 1336–1346, doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X.
  121. Gasperini, C.; Prosperini, L.; Tintoré, M.; Sormani, M.P.; Filippi, M.; Rio, J.; Palace, J.; Rocca, M.A.; Ciccarelli, O.; Barkhof, F.; et al. Unraveling Treatment Response in Multiple Sclerosis: A Clinical and MRI Challenge. *Neurology* **2019**, *92*, 180–192, doi:10.1212/WNL.0000000000006810.
  122. McDonald, W.I.; Compston, A.; Edan, G.; Goodkin, D.; Hartung, H.P.; Lublin, F.D.; McFarland, H.F.; Paty, D.W.; Polman, C.H.; Reingold, S.C.; et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **2001**, *50*, 121–127, doi:10.1002/ana.1032.
  123. Negrotto, L.; Tur, C.; Tintoré, M.; Arrambide, G.; Sastre-Garriga, J.; Río, J.; Comabella, M.; Nos, C.; Galán, I.; Vidal-Jordana, A.; et al. Should We Systematically Test Patients with Clinically Isolated Syndrome for Auto-Antibodies? *Mult. Scler.* **2015**, *21*, 1802–1810, doi:10.1177/1352458515575338.

124. Link, H.; Tibbling, G. Principles of Albumin and IgG Analyses in Neurological Disorders. III. Evaluation of IgG Synthesis within the Central Nervous System in Multiple Sclerosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1977**, *37*, 397–401, doi:10.1080/00365517709091498.
125. Abraira, V.; Alvarez-Cermeño, J.C.; Arroyo, R.; Cámara, C.; Casanova, B.; Cubillo, S.; de Andrés, C.; Espejo, C.; Fernández, O.; Ferrer, J.; et al. Utility of Oligoclonal IgG Band Detection for MS Diagnosis in Daily Clinical Practice. *J. Immunol. Methods* **2011**, *371*, 170–173, doi:10.1016/j.jim.2011.06.009.
126. Pihl-Jensen, G.; Schmidt, M.F.; Frederiksen, J.L. Multifocal Visual Evoked Potentials in Optic Neuritis and Multiple Sclerosis: A Review. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* **2017**, *128*, 1234–1245, doi:10.1016/j.clinph.2017.03.047.
127. Hardmeier, M.; Fuhr, P. Multimodal Evoked Potentials as Candidate Prognostic and Response Biomarkers in Clinical Trials of Multiple Sclerosis. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* **2021**, *38*, 171–180, doi:10.1097/WNP.0000000000000723.
128. Poser, C.M.; Paty, D.W.; Scheinberg, L.; McDonald, W.I.; Davis, F.A.; Ebers, G.C.; Johnson, K.P.; Sibley, W.A.; Silberberg, D.H.; Tourtellotte, W.W. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines for Research Protocols. *Ann. Neurol.* **1983**, *13*, 227–231, doi:10.1002/ana.410130302.
129. Polman, C.H.; Reingold, S.C.; Edan, G.; Filippi, M.; Hartung, H.-P.; Kappos, L.; Lublin, F.D.; Metz, L.M.; McFarland, H.F.; O'Connor, P.W.; et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann. Neurol.* **2005**, *58*, 840–846, doi:10.1002/ana.20703.
130. Polman, C.H.; Reingold, S.C.; Banwell, B.; Clanet, M.; Cohen, J. a.; Filippi, M.; Fujihara, K.; Havrdova, E.; Hutchinson, M.; Kappos, L.; et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 292–302, doi:10.1002/ana.22366.
131. Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the McDonald Criteria. *Lancet. Neurol.* **2018**, *17*, 162–173, doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
132. Markowitz, C.E. Interferon-Beta: Mechanism of Action and Dosing Issues. *Neurology* **2007**, *68*, S8–S11, doi:10.1212/01.wnl.0000277703.74115.d2.
133. Arnon, R.; Aharoni, R. Mechanism of Action of Glatiramer Acetate in Multiple Sclerosis and Its Potential for the Development of New Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101 Suppl*, 14593–14598, doi:10.1073/pnas.0404887101.

134. Claussen, M.C.; Korn, T. Immune Mechanisms of New Therapeutic Strategies in MS: Teriflunomide. *Clin. Immunol.* **2012**, *142*, 49–56, doi:10.1016/j.clim.2011.02.011.
135. Wilms, H.; Sievers, J.; Rickert, U.; Rostami-Yazdi, M.; Mrowietz, U.; Lucius, R. Dimethylfumarate Inhibits Microglial and Astrocytic Inflammation by Suppressing the Synthesis of Nitric Oxide, IL-1beta, TNF-Alpha and IL-6 in an in-Vitro Model of Brain Inflammation. *J. Neuroinflammation* **2010**, *7*, 30, doi:10.1186/1742-2094-7-30.
136. Linker, R.A.; Lee, D.-H.; Ryan, S.; van Dam, A.M.; Conrad, R.; Bista, P.; Zeng, W.; Hronowsky, X.; Buko, A.; Chollate, S.; et al. Fumaric Acid Esters Exert Neuroprotective Effects in Neuroinflammation via Activation of the Nrf2 Antioxidant Pathway. *Brain* **2011**, *134*, 678–692, doi:10.1093/brain/awq386.
137. Paik, J. Diroximel Fumarate in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis: A Profile of Its Use. *CNS Drugs* **2021**, *35*, 691–700, doi:10.1007/s40263-021-00830-z.
138. Rice, G.P.A.; Hartung, H.-P.; Calabresi, P.A. Anti-alpha4 Integrin Therapy for Multiple Sclerosis: Mechanisms and Rationale. *Neurology* **2005**, *64*, 1336–1342, doi:10.1212/01.WNL.0000158329.30470.D0.
139. Mandala, S.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G.-J.; Card, D.; Keohane, C.; et al. Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. *Science* **2002**, *296*, 346–349, doi:10.1126/science.1070238.
140. Dumitrescu, L.; Papathanasiou, A.; Coclitu, C.; Garjani, A.; Evangelou, N.; Constantinescu, C.S.; Popescu, B.O.; Tanasescu, R. An Update on the Use of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2023**, *24*, 495–509, doi:10.1080/14656566.2023.2178898.
141. Hauser, S.L.; Bar-Or, A.; Comi, G.; Giovannoni, G.; Hartung, H.-P.; Hemmer, B.; Lublin, F.; Montalban, X.; Rammohan, K.W.; Selmaj, K.; et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 221–234, doi:10.1056/NEJMoa1601277.
142. Margoni, M.; Preziosa, P.; Filippi, M.; Rocca, M.A. Anti-CD20 Therapies for Multiple Sclerosis: Current Status and Future Perspectives. *J. Neurol.* **2022**, *269*, 1316–1334, doi:10.1007/s00415-021-10744-x.
143. Bielekova, B.; Becker, B.L. Monoclonal Antibodies in MS: Mechanisms of Action. *Neurology* **2010**, *74 Suppl 1*, S31–S40, doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97ed3.
144. Leist, T.P.; Weissert, R. Cladribine: Mode of Action and Implications for Treatment of Multiple Sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* **2011**, *34*, 28–35, doi:10.1097/WNF.0b013e318204cd90.

145. De Andres, C.; García, M.I.; Goicoechea, H.; Martínez-Ginés, M.L.; García-Domínguez, J.M.; Martín, M.L.; Romero-Delgado, F.; Benguría, a.; Sanjurjo, M.; López-Fernández, L. a. Genes Differentially Expressed by Methylprednisolone in Vivo in CD4 T Lymphocytes from Multiple Sclerosis Patients: Potential Biomarkers. *Pharmacogenomics J.* **2018**, *18*, 98–105, doi:10.1038/tpj.2016.71.
146. Sundström, P.; Salzer, J. Vitamin D and Multiple Sclerosis—from Epidemiology to Prevention. *Acta Neurol. Scand.* **2015**, *132*, 56–61, doi:10.1111/ane.12432.
147. Holick, M.F. Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281, doi:10.1056/NEJMra070553.
148. Hart, P.H.; Gorman, S.; Finlay-Jones, J.J. Modulation of the Immune System by UV Radiation: More than Just the Effects of Vitamin D? *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 584–596, doi:10.1038/nri3045.
149. Salzer, J.; Biström, M.; Sundström, P. Vitamin D and Multiple Sclerosis: Where Do We Go from Here? *Expert Rev. Neurother.* **2014**, *14*, 9–18, doi:10.1586/14737175.2014.864952.
150. Deluca, H.F.; Cantorna, M.T. Vitamin D: Its Role and Uses in Immunology 1 . *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579–2585, doi:10.1096/fj.01-0433rev.
151. Lysandropoulos, A.P.; Jaquiéry, E.; Jilek, S.; Pantaleo, G.; Schlupe, M.; Du Pasquier, R. a. Vitamin D Has a Direct Immunomodulatory Effect on CD8+ T Cells of Patients with Early Multiple Sclerosis and Healthy Control Subjects. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *233*, 240–244, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.11.008.
152. Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B.; Prat, A. Human TH17 Lymphocytes Promote Blood-Brain Barrier Disruption and Central Nervous System Inflammation. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1173–1175, doi:10.1038/nm1651.
153. Mangan, P.R.; Harrington, L.E.; O’Quinn, D.B.; Helms, W.S.; Bullard, D.C.; Elson, C.O.; Hatton, R.D.; Wahl, S.M.; Schoeb, T.R.; Weaver, C.T. Transforming Growth Factor-Beta Induces Development of the T(H)17 Lineage. *Nature* **2006**, *441*, 231–234, doi:10.1038/nature04754.
154. Kleiter, I.; Song, J.; Lukas, D.; Hasan, M.; Neumann, B.; Croxford, A.L.; Pedré, X.; Hövelmeyer, N.; Yogev, N.; Mildner, A.; et al. Smad7 in T Cells Drives T Helper 1 Responses in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Brain* **2010**, *133*, 1067–1081, doi:10.1093/brain/awq039.
155. Zhang, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, 1–18, doi:10.1101/cshperspect.a022129.
156. Budi, E.H.; Duan, D.; Derynck, R. Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 658–672, doi:10.1016/j.tcb.2017.04.005.

157. Akhurst, R.J.; Hata, A. Targeting the TGF $\beta$  Signalling Pathway in Disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 790–811, doi:10.1038/nrd3810.
158. Häusler, D.; Weber, M.S. Vitamin D Supplementation in Central Nervous System Demyelinating Disease-Enough Is Enough. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20010218.
159. Nanduri, R.; Mahajan, S.; Bhagyaraj, E.; Sethi, K.; Kalra, R.; Chandra, V.; Gupta, P. The Active Form of Vitamin D Transcriptionally Represses Smad7 Signaling and Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) to Inhibit the Differentiation of a Inflammatory T Helper Cell Subset and Suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 12222–12236, doi:10.1074/jbc.M114.621839.
160. Naghavi Gargari, B.; Behmanesh, M.; Shirvani Farsani, Z.; Pahlevan Kakhki, M.; Azimi, A.R. Vitamin D Supplementation up-Regulates IL-6 and IL-17A Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 414–419, doi:10.1016/j.intimp.2015.06.033.
161. Farsani, Z.S.; Behmanesh, M.; Sahraian, M.A. Interleukin-10 but Not Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Gene Expression Is up-Regulated by Vitamin D Treatment in Multiple. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *350*, 18–23, doi:10.1016/j.jns.2015.01.030.
162. Heine, G.; Niesner, U.; Chang, H.-D.; Steinmeyer, A.; Zügel, U.; Zuberbier, T.; Radbruch, A.; Worm, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Promotes IL-10 Production in Human B Cells. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 2210–2218, doi:10.1002/eji.200838216.
163. Salmon, R.A.; Guo, X.; Teh, H.S.; Schrader, J.W. The p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Can Have Opposing Roles in the Antigen-Dependent or Endotoxin-Stimulated Production of IL-12 and IFN-Gamma. *Eur. J. Immunol.* **2001**, *31*, 3218–3227, doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3218::aid-immu3218>3.0.co;2-9.
164. Yi, A.-K.; Yoon, J.-G.; Yeo, S.-J.; Hong, S.-C.; English, B.K.; Krieg, A.M. Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in CpG DNA-Mediated IL-10 and IL-12 Production: Central Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase in the Negative Feedback Loop of the CpG DNA-Mediated Th1 Response. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 4711–4720, doi:10.4049/jimmunol.168.9.4711.
165. Kim, D.; Witt, E.E.; Schubert, S.; Sotirchos, E.; Bhargava, P.; Mowry, E.M.; Sachs, K.; Bilen, B.; Steinman, L.; Awani, A.; et al. Peripheral T-Cells, B-Cells, and Monocytes from Multiple Sclerosis Patients Supplemented with High-Dose Vitamin D Show Distinct Changes in Gene Expression Profiles. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14224737.
166. Sun, Y.; Zuo, X.; Zheng, X.; Zhou, F.; Liang, B.; Liu, H.; Chang, R.; Gao, J.; Sheng, Y.; Cui, H.; et al. A Comprehensive Association Analysis Confirms

- ZMIZ1 to Be a Susceptibility Gene for Vitiligo in Chinese Population. *J. Med. Genet.* **2014**, *51*, 345–353, doi:10.1136/jmedgenet-2013-102233.
167. Patsopoulos, N. a; the Bayer Pharma MS Genetics Working Group ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, the S.C. of S.E.Ifñ.-1b and a C.-A.; de Bakker, P.I.W.; the Bayer Pharma MS Genetics Working Group ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, the S.C. of S.E.Ifñ.-1b and a C.-A.; de Bakker, P.I.W.; Esposito, F.; Reischl, J.; Lehr, S.; Bauer, D.; Heubach, J.; et al. Genome-Wide Meta-Analysis Identifies Novel Multiple Sclerosis Susceptibility Loci. *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 897–912, doi:10.1002/ana.22609.Genomewide.
  168. Booth, D.R.; Ding, N.; Parnell, G.P.; Shahijanian, F.; Coulter, S.; Schibeci, S.D.; Atkins, A.R.; Stewart, G.J.; Evans, R.M.; Downes, M.; et al. Cistromic and Genetic Evidence That the Vitamin D Receptor Mediates Susceptibility to Latitude-Dependent Autoimmune Diseases. *Genes Immun.* **2016**, *17*, 213–219, doi:10.1038/gene.2016.12.
  169. Waisman, A.; Hauptmann, J.; Regen, T. The Role of IL-17 in CNS Diseases. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 625–637, doi:10.1007/s00401-015-1402-7.
  170. Li, Y.-F.; Zhang, S.-X.; Ma, X.-W.; Xue, Y.-L.; Gao, C.; Li, X.-Y. Levels of Peripheral Th17 Cells and Serum Th17-Related Cytokines in Patients with Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2017**, *18*, 20–25, doi:10.1016/j.msard.2017.09.003.
  171. Khoy, K.; Mariotte, D.; Defer, G.; Petit, G.; Toutirais, O.; Le Mauff, B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 549842, doi:10.3389/fimmu.2020.549842.
  172. Clerico, M.; Artusi, C.A.; Liberto, A. Di; Rolla, S.; Bardina, V.; Barbero, P.; Mercanti, S.F. De; Durelli, L. Natalizumab in Multiple Sclerosis: Long-Term Management. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18050940.
  173. Ara, J.; See, J.; Mamontov, P.; Hahn, A.; Bannerman, P.; Pleasure, D.; Grinspan, J.B. Bone Morphogenetic Proteins 4, 6, and 7 Are up-Regulated in Mouse Spinal Cord during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 125–135, doi:10.1002/jnr.21462.
  174. Urshansky, N.; Mausner-Fainberg, K.; Auriel, E.; Regev, K.; Bornstein, N.M.; Karni, A. Reduced Production of Noggin by Immune Cells of Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *232*, 171–178, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.10.007.
  175. Urshansky, N.; Mausner-Fainberg, K.; Auriel, E.; Regev, K.; Karni, A. Low and Dysregulated Production of Follistatin in Immune Cells of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *238*, 96–103, doi:10.1016/j.jneuroim.2011.08.003.

176. Río, J.; Nos, C.; Tintoré, M.; Téllez, N.; Galán, I.; Pelayo, R.; Comabella, M.; Montalban, X. Defining the Response to Interferon-Beta in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Ann. Neurol.* **2006**, *59*, 344–352, doi:10.1002/ana.20740.
177. Río, J.; Castilló, J.; Rovira, A.; Tintoré, M.; Sastre-Garriga, J.; Horga, A.; Nos, C.; Comabella, M.; Aymerich, X.; Montalbán, X. Measures in the First Year of Therapy Predict the Response to Interferon Beta in MS. *Mult. Scler.* **2009**, *15*, 848–853, doi:10.1177/1352458509104591.
178. Sormani, M.P.; Río, J.; Tintoré, M.; Signori, a.; Li, D.; Cornelisse, P.; Stubinski, B.; Stromillo, M.L.; Montalban, X.; De Stefano, N. Scoring Treatment Response in Patients with Relapsing Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2013**, *19*, 605–612, doi:10.1177/1352458512460605.
179. Grinspan, J.B.; Edell, E.; Carpio, D.F.; Beesley, J.S.; Lavy, L.; Pleasure, D.; Golden, J.A. Stage-Specific Effects of Bone Morphogenetic Proteins on the Oligodendrocyte Lineage. *J. Neurobiol.* **2000**, *43*, 1–17.
180. Mabie, P.C.; Mehler, M.F.; Marmur, R.; Papavasiliou, a.; Song, Q.; Kessler, J. a. Bone Morphogenetic Proteins Induce Astroglial Differentiation of Oligodendroglial-Astroglial Progenitor Cells. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 4112–4120, doi:10.1523/jneurosci.17-11-04112.1997.
181. Colak, D.; Mori, T.; Brill, M.S.; Pfeifer, A.; Falk, S.; Deng, C.; Monteiro, R.; Mummery, C.; Sommer, L.; Götz, M. Adult Neurogenesis Requires Smad4-Mediated Bone Morphogenic Protein Signaling in Stem Cells. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 434–446, doi:10.1523/JNEUROSCI.4374-07.2008.
182. Coskun, V.; Venkatraman, G.; Yang, H.; Rao, M.S.; Luskin, M.B. Retroviral Manipulation of the Expression of Bone Morphogenetic Protein Receptor Ia by SVZa Progenitor Cells Leads to Changes in Their p19(INK4d) Expression but Not in Their Neuronal Commitment. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **2001**, *19*, 219–227, doi:10.1016/s0736-5748(00)00092-7.
183. Lu, L.; Ma, J.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, F.; Yu, J.; He, G.; Xu, B.; Brand, D.D.; Horwitz, D. a; et al. Synergistic Effect of TGFbeta Superfamily Members on the Induction of FoxP3+ Regulatory Cells. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 142–152, doi:10.1002/eji.200939618.Synergistic.
184. Holick, M.F.; Binkley, N.C.; Bischoff-Ferrari, H.A.; Gordon, C.M.; Hanley, D.A.; Heaney, R.P.; Murad, M.H.; Weaver, C.M. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1911–1930, doi:10.1210/jc.2011-0385.
185. Ross, A.C.; Manson, J.E.; Abrams, S.A.; Aloia, J.F.; Brannon, P.M.; Clinton, S.K.; Durazo-Arvizu, R.A.; Gallagher, J.C.; Gallo, R.L.; Jones, G.; et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from

- the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 53–58, doi:10.1210/jc.2010-2704.
186. Pilz, S.; Zittermann, A.; Trummer, C.; Theiler-Schwetz, V.; Lerchbaum, E.; Keppel, M.H.; Grübler, M.R.; März, W.; Pandis, M. Vitamin D Testing and Treatment: A Narrative Review of Current Evidence. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, R27–R43, doi:10.1530/EC-18-0432.
  187. Cashman, K.D.; Ritz, C.; Kiely, M.; Collaborators, O. Improved Dietary Guidelines for Vitamin D: Application of Individual Participant Data (IPD)-Level Meta-Regression Analyses. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9050469.
  188. De Niet, S.; Coffiner, M.; Da Silva, S.; Jandrain, B.; Souberbielle, J.-C.; Cavalier, E. A Randomized Study to Compare a Monthly to a Daily Administration of Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10060659.
  189. Ish-Shalom, S.; Segal, E.; Salganik, T.; Raz, B.; Bromberg, I.L.; Vieth, R. Comparison of Daily, Weekly, and Monthly Vitamin D<sub>3</sub> in Ethanol Dosing Protocols for Two Months in Elderly Hip Fracture Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 3430–3435, doi:10.1210/jc.2008-0241.
  190. Mittal, M.; Yadav, V.; Khadgawat, R.; Kumar, M.; Sherwani, P. Efficacy and Safety of 90,000 IU versus 300,000 IU Single Dose Oral Vitamin D in Nutritional Rickets: A Randomized Controlled Trial. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2018**, *22*, 760–765, doi:10.4103/ijem.IJEM\_84\_18.
  191. Burton, J.M.; Kimball, S.; Vieth, R.; Bar-Or, A.; Dosch, H.-M.; Cheung, R.; Gagne, D.; D’Souza, C.; Ursell, M.; O’Connor, P. A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Vitamin D<sub>3</sub> and Calcium in Multiple Sclerosis. *Neurology* **2010**, *74*, 1852–1859, doi:10.1212/WNL.0b013e3181e1cec2.
  192. Kimball, S.; Vieth, R.; Dosch, H.-M.; Bar-Or, A.; Cheung, R.; Gagne, D.; O’Connor, P.; D’Souza, C.; Ursell, M.; Burton, J.M. Cholecalciferol plus Calcium Suppresses Abnormal PBMC Reactivity in Patients with Multiple Sclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 2826–2834, doi:10.1210/jc.2011-0325.
  193. Smolders, J.; Peelen, E.; Thewissen, M.; Cohen Tervaert, J.W.; Menheere, P.; Hupperts, R.; Damoiseaux, J. Safety and T Cell Modulating Effects of High Dose Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation in Multiple Sclerosis. *PLoS One* **2010**, *5*, e15235, doi:10.1371/journal.pone.0015235.
  194. Kampman, M.T.; Steffensen, L.H.; Mellgren, S.I.; Jørgensen, L. Effect of Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation on Relapses, Disease Progression, and Measures of Function in Persons with Multiple Sclerosis: Exploratory Outcomes from a Double-Blind Randomised Controlled Trial. *Mult. Scler.* **2012**, *18*, 1144–1151, doi:10.1177/1352458511434607.

195. Stein, M.S.; Liu, Y.; Gray, O.M.; Baker, J.E.; Kolbe, S.C.; Ditchfield, M.R.; Egan, G.F.; Mitchell, P.J.; Harrison, L.C.; Butzkueven, H.; et al. A Randomized Trial of High-Dose Vitamin D2 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurology* **2011**, *77*, 1611–1618, doi:10.1212/WNL.0b013e3182343274.
196. Hupperts, R.; Smolders, J.; Vieth, R.; Holmøy, T.; Marhardt, K.; Schlupe, M.; Killestein, J.; Barkhof, F.; Beelke, M.; Grimaldi, L.M.E. Randomized Trial of Daily High-Dose Vitamin D3 in Patients with RRMS Receiving Subcutaneous Interferon B-1a. *Neurology* **2019**, *93*, E1906–E1916, doi:10.1212/WNL.0000000000008445.
197. Smolders, J.; Hupperts, R.; Barkhof, F.; Grimaldi, L.M.E.; Holmoy, T.; Killestein, J.; Rieckmann, P.; Schlupe, M.; Vieth, R.; Hostalek, U.; et al. Efficacy of Vitamin D3 as Add-on Therapy in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Receiving Subcutaneous Interferon B-1a: A Phase II, Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J. Neurol. Sci.* **2011**, *311*, 44–49, doi:10.1016/j.jns.2011.04.013.
198. Camu, W.; Lehert, P.; Pierrot-Deseilligny, C.; Hautecoeur, P.; Besserve, A.; Deleglise, A.S.J.; Payet, M.; Thouvenot, E.; Souberbielle, J.C. Cholecalciferol in Relapsing-Remitting MS: A Randomized Clinical Trial (CHOLINE). *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* **2019**, *6*, 1–7, doi:10.1212/NXI.0000000000000597.
199. Van der Mei, I.A.F.; Ponsonby, A.-L.; Dwyer, T.; Blizzard, L.; Taylor, B. V.; Kilpatrick, T.; Butzkueven, H.; McMichael, A.J. Vitamin D Levels in People with Multiple Sclerosis and Community Controls in Tasmania, Australia. *J. Neurol.* **2007**, *254*, 581–590, doi:10.1007/s00415-006-0315-8.
200. Simpson, S.J.; van der Mei, I.; Lucas, R.M.; Ponsonby, A.-L.; Broadley, S.; Blizzard, L.; Taylor, B. Sun Exposure across the Life Course Significantly Modulates Early Multiple Sclerosis Clinical Course. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 16, doi:10.3389/fneur.2018.00016.
201. Hart, P.H.; Jones, A.P.; Trend, S.; Cha, L.; Fabis-Pedrini, M.J.; Cooper, M.N.; d'Este, C.; Geldenhuys, S.; Carroll, W.M.; Byrne, S.N.; et al. A Randomised, Controlled Clinical Trial of Narrowband UVB Phototherapy for Clinically Isolated Syndrome: The PhoCIS Study. *Mult. Scler. J. - Exp. Transl. Clin.* **2018**, *4*, 2055217318773112, doi:10.1177/2055217318773112.
202. Smolders, J.; Menheere, P.; Kessels, A.; Damoiseaux, J.; Hupperts, R. Association of Vitamin D Metabolite Levels with Relapse Rate and Disability in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler.* **2008**, *14*, 1220–1224, doi:10.1177/1352458508094399.
203. Smolders, J.; Torkildsen, Ø.; Camu, W.; Holmøy, T. An Update on Vitamin D and Disease Activity in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2019**, *33*, 1187–1199, doi:10.1007/s40263-019-00674-8.

204. Sirbe, C.; Rednic, S.; Grama, A.; Pop, T.L. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23179784.
205. Munger, K.L.; Köchert, K.; Simon, K.C.; Kappos, L.; Polman, C.H.; Freedman, M.S.; Hartung, H.P.; Miller, D.H.; Montalbán, X.; Edan, G.; et al. Molecular Mechanism Underlying the Impact of Vitamin D on Disease Activity of MS. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2014**, *1*, 605–617, doi:10.1002/acn3.91.
206. Kurtzke, J.F. Rating Neurologic Impairment in Multiple Sclerosis: An Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* **1983**, *33*, 1444–1452, doi:10.1212/wnl.33.11.1444.
207. Goodkin, D.E.; Cookfair, D.; Wende, K.; Bourdette, D.; Pullicino, P.; Scherokman, B.; Whitham, R. Inter- and Intrarater Scoring Agreement Using Grades 1.0 to 3.5 of the Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* **1992**, *42*, 859–863, doi:10.1212/wnl.42.4.859.

## **9. ANEXOS**



## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo I. Rio-Score

Adaptado de (Río J. et al, 2009) [177]

#### Rio-Score:

Este sistema de puntuación se basa en una combinación de criterios de RM, brote y EDSS, definidos tras un año de tratamiento.

- A. *Criterio de RM* = 1, si el paciente tenía (en la RM anual) > 2 lesiones activas en T2, definidas como lesiones potenciadas en T2 nuevas o en aumento, más el número de lesiones captantes de gadolinio potenciadas en T1 durante el primer año.
- B. *Criterio de Brote* = 1, si el paciente presentaba  $\geq 1$  brote durante el primer año.
- C. *Criterio de EDSS* = 1, si se produce un aumento en la puntuación EDSS del paciente  $\geq 1$  punto, mantenido durante al menos 6 meses y confirmado al final del período de seguimiento.

## **9.2 Anexo II. Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS)**

**Adaptado de (Kurtzke JF., 1983) [206]**

### **Escala EDSS: criterios de puntuación**

#### **Sistema funcional (SF)**

##### **Piramidal**

0. Normal.
1. Signos anormales sin incapacidad.
2. Incapacidad mínima.
3. Paraparesia o hemiparesia leve o moderada. Monoparesia grave.
4. Paraparesia o hemiparesia grave. Monoplejía o cuadriparesia moderada.
5. Paraplejía o hemiplejía. Cuadriparesia intensa.
6. Cuadriplejía.

##### **Cerebelo**

0. Normal.
  1. Signos anormales sin incapacidad.
  2. Ligera ataxia.
  3. Moderada ataxia de los miembros o del tronco.
  4. Ataxia intensa de todas las extremidades.
  5. Incapaz de realizar movimientos coordinados por ataxia.
- X. Añadir tras cada puntuación en caso de debilidad grado 3 que dificulte la prueba.

## **Tronco del encéfalo**

0. Normal.
1. Únicamente signos.
2. Nistagmo moderado o cualquier otro tipo de incapacidad.
3. Nistagmo intenso, parálisis extraocular intensa o moderada incapacidad por otros pares craneales.
4. Disartria intensa o cualquier otro tipo de incapacidad.
5. Incapacidad para tragar o hablar.

## **Sensibilidad**

0. Normal.
1. Alteración de la sensibilidad vibratoria o grafestesia en una o dos extremidades.
2. Disminución ligera de la sensibilidad táctil o dolorosa, o de la posicional y/o disminución ligera de la sensibilidad vibratoria en 1 o 2 miembros o vibratoria (o grafestesia) en 3 o 4 miembros.
3. Id. moderada, incluida alteración propioceptiva en 3 o 4 miembros.
4. Id. intensa, o bien grave alteración propioceptiva en más de 2 miembros.
5. Pérdida de sensibilidad en una o dos extremidades o bien disminución del tacto o dolor y/o pérdida del sentido posicional en más de 2 miembros.
6. Pérdida de sensibilidad prácticamente total por debajo de la cabeza.

## **Vejiga e intestino (Redefinición de Goodkin DE. et al, 1992) [207]**

**Instrucciones: Añada 1 punto más en la puntuación de 1-4 vesical si se usa autocateterismo vesical. Puntúe la situación peor del modo siguiente:**

**Vejiga:**

0. Normal.
1. Ligero titubeo, urgencia o retención.
2. Moderado titubeo, urgencia o retención tanto del intestino como de la vejiga, o incontinencia urinaria poco frecuente.
3. Incontinencia < semanal.
4. Incontinencia > semanal.
5. Incontinencia diaria.
6. Catéter vesical.

**Intestino:**

0. Normal.
1. Estreñimiento de < diario, sin incontinencia.
2. Estreñimiento de menos de a diario pero no incontinencia.
3. Incontinencia < semanal.
4. Incontinencia > semanal pero no a diario.
5. Ningún control intestinal.
6. Grado 5 intestinal más grado 5 de disfunción vesical.

**Visión**

0. Normal.
1. Escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
2. El ojo que esa peor con un escotoma tiene de agudeza visual entre 30/30 y 20/59.

3. El ojo peor (por escotoma o alteración de campo) con agudeza visual máxima entre 20/60 y 20/99.
  4. Id. entre 20/100 y 20/200; igual un grado 3 más la máxima agudeza en el mejor ojo de 20/60 o inferior.
  5. Id. en el ojo peor con agudeza inferior a 20/200; o bien grado 4 más máxima agudeza en el ojo mejor de 20/60 o menos.
  6. Grado 5 más agudeza visual máxima del mejor ojo de 20/60 o inferior.
- X. Añadir tras la puntuación en los grado 0-5 si existe palidez temporal.

### **Funciones mentales**

0. Normal.
1. Alteración del estado de ánimo únicamente (no afecta a la puntuación EDSS).
2. Ligera alteración cognitiva.
3. Moderada alteración cognitiva.
4. Marcada alteración cognitiva.
5. Demencia o síndrome cerebral crónico.

V. Desconocido (en cada SF).

### **Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS)**

- 0.** Exploración neurológica normal (en la función mental se acepta el grado 1).
- 1.0** Ninguna incapacidad. Mínimos hallazgos exploratorios en uno de los SF (grado 1, exceptuando las funciones mentales).
- 1.5** Ninguna incapacidad. Mínimos hallazgos en más de uno de los SF (más de un grado 1, exceptuando las funciones mentales).

- 2.0** Mínima incapacidad en uno de los SF (un grado 2, el resto con grado 0 ó 1).
- 2.5** Mínima incapacidad en dos de los SF (dos grados 2, el resto con grado 0 ó 1).
- 3.0** Moderada incapacidad en uno de los SF (un grado 3 , el resto con grado 0 ó 1) o ligera incapacidad en tres o cuatro SF (tres/cuatro con grados 2, el resto con grado 0 ó 1). Completamente ambulante.
- 3.5** Completamente ambulante pero con moderada incapacidad en uno de los SF (grado 3) y uno o dos SF con grado 2; o dos SF con grado 3; o cinco SF con grado 2 (con 0 ó 1 en el resto).
- 4.0** Completamente ambulante sin ayuda, independiente, más de 12 horas al día a pesar de sufrir una grave incapacidad consistente en un SF con grado 4 (con grados 0 ó 1 en el resto), o combinaciones de grados menores con puntuaciones mayores que las mencionadas. Puede caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
- 4.5** Completamente ambulante sin ayuda la mayoría del día. Puede trabajar una jornada completa, aunque tiene alguna limitación para tener una actividad plena, o necesita una ayuda mínima. Grave incapacidad consistente en un SF con grado 4 (con grados 0 ó 1 en el resto) o combinaciones mayores que las mencionadas antes. Puede caminar sin ayuda o descanso 300 metros.
- 5.0** Camina sin ayuda o descanso unos 200 metros. Tiene una incapacidad grave que dificulta todas sus actividades diarias (por ejemplo, para trabajar necesita condiciones especiales). Grado 5 en uno de los SF y con grados 0 ó 1 en el resto, o combinaciones de grados menores que habitualmente sobrepasan la puntuación de 4,0.
- 5.5** Camina sin ayuda o descanso unos 100 metros. Tiene una incapacidad grave que imposibilita todas sus actividades diarias. Grado 5 en uno de los SF con grados 0

- ó 1 en el resto, o combinaciones de grados menores que habitualmente sobrepasan la puntuación de 4,0.
- 6.0** Necesita apoyo (bastón, muleta o corrector) intermitente o unilateral para caminar 100 metros con o sin descanso. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 grados 3).
- 6.5** Necesita apoyo bilateral (bastones, muleta o corrector) constante para andar 20 metros sin descanso. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 grados 3).
- 7.0** No puede andar más de 5 metros sin ayuda, está en silla de ruedas casi permanentemente. Utiliza una silla normal que conduce él mismo y puede cambiarse solo. Suele estar en la silla más de 12 horas al día. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 1 grado 4. Excepcionalmente es un grado 5 de la vía piramidal aislado).
- 7.5** No puede dar más que unos pocos pasos, está en silla de ruedas permanentemente, necesita ayuda para cambiarse. Conduce él mismo pero no puede utilizar una silla normal durante todo el día; puede necesitar una silla con motor. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 1 grado 4).
- 8.0** Actividad limitada a la cama o silla, puede usar una silla de ruedas para desplazarse, pero no puede estar fuera de la cama la mayoría del día. Conserva en parte su cuidado personal. Generalmente mantiene la funcionalidad de sus brazos. (Tiene habitualmente varios SF en grado 4).
- 8.5** Pasa la mayor parte del día en la cama. Conserva en parte su cuidado personal. Generalmente mantiene la funcionalidad de sus brazos. (Tiene habitualmente varios SF en grado 4).

**9.0** Está encamado. Es absolutamente dependiente. Puede comunicarse y comer (La mayoría de los SF supera el grado 4).

**9.5** Está encamado. Es absolutamente dependiente. No puede comunicarse o comer/tragar. Casi todos los SF superan el grado 4.

**10** Muerte debida a EM.

### 9.3 Anexo III

**Tabla de variables cualitativas/cuantitativas y datos de expresión génica individual**

Patient ID	DMT	EDSSbasal	EDSSfinal	Relapse (0=no; 1=yes)	MRI activity (0=no; 1=yes)	EDSSprogression (0=no; 1=yes)
VD1	Natalizumab	3,5	2,0	0	0	0
VD2	Natalizumab	2,0	1,0	0	0	0
VD3	Interferon beta1a	1,0	1,0	0	0	0
VD4	Natalizumab	0,0	0,0	0	0	0
VD5	Natalizumab	2,5	2,5	0	0	0
VD6	Natalizumab	6,0	6,0	0	0	0
VD7	Natalizumab	6,0	6,0	1	0	0
VD8	Natalizumab	2,5	1,5	0	0	0
VD9	Glatiramer acetate	1,5	1,5	0	0	0
VD10	Teriflunomide	0,0	0,0	0	0	0
VD11	Interferon beta1a	1,0	1,0	0	0	0
VD12	Natalizumab	0,0	0,0	0	0	0
VD13	Teriflunomide	0,0	3,0	1	0	1
VD14	Natalizumab	1,5	1,5	1	0	0
VD15	Glatiramer acetate	0,0	0,0	1	0	0
VD16	Interferon beta1a	4,0	6,0	0	0	1
VD17	Glatiramer acetate	1,0	1,0	0	1	0
VD18	Dimethyl fumarate	1,0	1,0	0	0	0
VD19	Glatiramer acetate	2,0	2,0	0	0	0
VD20	Dimethyl fumarate	1,0	1,0	0	0	0
VD21	Dimethyl fumarate	0,0	0,0	0	0	0

RioScorebasal	RioScorefinal	SMAD7T0	SMAD7T1	SMAD7T6	ERK1T0	ERK1T1	ERK1T6	ZMIZ1T0
1	0	1,000	1,388	13,584	1,000	1,263	5,419	1,000
0	0	13,850	1,806	12,419	5,086	2,317	6,367	0,495
1	0	9,298	3,609	7,726	5,525	1,582	5,309	0,732
0	0	17,153	5,674	15,227	6,227	4,612	6,499	0,816
0	0	3,900	2,599	33,041	2,905	2,167	6,828	0,908
0	0	0,538	4,658	10,409	1,137	4,804	5,333	0,506
0	1	4,896	0,521	20,234	3,735	1,012	5,604	0,596
1	0	7,455	3,271	17,101	4,546	3,247	4,857	0,653
1	0	3,935	5,769	12,782	3,270	3,617	5,182	0,905
0	0	7,789	3,962	6,267	5,743	4,412	6,423	0,582
1	0	11,294	4,968	9,518	7,331	4,971	5,390	0,855
2	0	43,519	2,883	15,037	11,606	4,638	6,264	1,518
1	2	11,400	12,315	28,048	3,655	6,537	4,862	0,734
0	1	0,439	6,080	12,222	1,105	4,600	7,089	0,586
0	1	4,341	12,467	16,732	2,446	5,632	5,661	0,573
0	1	1,309	2,157	81,201	0,658	2,865	5,697	1,326
1	1	22,629	0,378	127,528	6,465	0,681	6,128	0,808
2	0	0,203	1,261	25,442	0,861	1,908	4,150	0,682
2	0	9,569	7,250	13,380	7,861	7,268	6,750	0,601
3	0	22,838	12,352	23,305	6,530	6,325	4,884	0,859
0	0	10,400	12,436	8,756	7,531	7,421	4,022	0,778

ZMIZ1T1	ZMIZ1T6	BMP2T0	BMP2T1	BMP2T6	BMPRII0	BMPRII1	BMPRII6	BMP4T0
0,939	0,570	1,000	1,077	1,655	1,000	0,921	3,255	1,000
0,468	0,660	2,304	6,742	1,738	5,697	2,428	5,305	0,608
0,592	0,638	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,611	0,829	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,647	0,797	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,604	0,506	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,578	0,651	0,000	0,000	0,000	5,232	0,657	4,035	7,881
0,128	0,532	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,759	0,663	0,000	14,180	14,806	2,827	3,851	5,160	1,265
0,477	0,507	0,000	0,000	0,000	7,919	7,001	5,838	2,956
0,538	0,656	21,858	25,359	2,962	6,887	5,129	5,636	5,084
1,466	0,764	18,749	0,000	14,623	10,408	2,383	6,081	6,987
0,758	0,949	13,665	7,894	28,233	5,796	7,287	6,292	0,207
0,645	0,897	86,744	2,611	14,196	3,064	6,447	7,750	10,868
0,607	0,713	19,363	0,000	0,721	3,149	6,837	6,396	2,807
0,664	1,237	24,623	6,755	22,046	1,393	4,786	7,663	0,296
2,241	1,191	11,383	0,000	2,572	7,752	0,652	9,176	1,938
0,390	0,667	0,000	0,000	0,000	0,719	7,635	4,395	0,000
0,601	0,816	0,227	0,402	0,000	9,107	5,623 omitted	2,435	2,435
0,761	0,831	0,000	12,444	14,786	8,944	6,604	6,654	0,246
0,719	0,687	5,403	0,000	0,000	11,668	7,349	7,218	9,688

	BMP4T1	BMP4T6	BMP5T0	BMP5T1	BMP5T6
	4,497	5,316	1,000	0,000	0,000
	0,463	1,104	0,000	0,000	0,048
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2,629	4,107	0,000	0,000	0,213
	5,616	0,835	0,109	0,216	0,011
	0,000	2,419	0,000	0,000	0,034
	6,058	6,281	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,000	0,144	0,047
	13,078	27,627	0,248	0,549	0,246
	3,135	0,000	0,000	0,000	0,100
	0,000	2,462	0,000	0,804	0,178
	0,000	2,043	0,000	0,000	1,086
	13,587	1,756	0,008	0,000	0,018
	2,094	0,000	0,000	0,000 omitted	
	1,620	3,729	0,000	0,000	0,046
	4,730	16,388	0,018	0,000	0,000

**Tabla 7.** Variables cualitativas/cuantitativas y datos de expresión génica individual. Patient ID, identificador de paciente; DMT, fármaco modificador de la enfermedad; EDSS basal, EDSS al inicio del estudio; EDSS final, EDSS al año del estudio; Relapse, brote; MRI activity, actividad en resonancia magnética; EDSS progression, progresión en la EDSS; RioScore basal, Rio Score al inicio del estudio; RioScore final, Rio Score al año del estudio; *SMAD7T0*, expresión de *SMAD7* al inicio; *SMAD7T1*, expresión de *SMAD7* al mes de la suplementación; *SMAD7T6*, expresión de *SMAD7* a los seis meses de la suplementación; *ERK1T0*, expresión de *ERK1* al inicio; *ERK1T1*, expresión de *ERK1* al mes de la suplementación; *ERK1T6*, expresión de *ERK1* a los seis meses de la suplementación; *ZMIZ1T0*, expresión de *ZMIZ1* al inicio; *ZMIZ1T1*, expresión de *ZMIZ1* al mes de la suplementación; *ZMIZ1T6*, expresión de *ZMIZ1* a los seis meses de la suplementación; *BMP2T0*, expresión de *BMP2* al inicio; *BMP2T1*, expresión de *BMP2* al mes de la suplementación; *BMP2T6*, expresión de *BMP2* a los seis meses de la suplementación; *BMPRIIT0*, expresión de *BMPRII* al inicio; *BMPRIIT1*, expresión de *BMPRII* al mes de la suplementación; *BMPRIIT6*, expresión de *BMPRII* a los seis meses de la suplementación; *BMP4T0*, expresión de *BMP4* al inicio; *BMP4T1*, expresión de *BMP4* al mes de la suplementación; *BMP4T6*, expresión de *BMP4* a los seis meses de la suplementación; *BMP5T0*, expresión de *BMP5* al inicio; *BMP5T1*, expresión de *BMP5* al mes de la suplementación; *BMP5T6*, expresión de *BMP5* a los seis meses de la suplementación.

## 9.4 Anexo IV

### Changes in the Expression of TGF-Beta Regulatory Pathway Genes Induced by Vitamin D in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis

Alberto Lozano-Ros, María L. Martínez-Ginés, José M. García-Domínguez, Sara Salvador-Martín, Haydee Goicochea-Briceño, Juan P. Cuello, Ariana Meldaña-Rivera, Yolanda Higuera-Hernández, María Sanjurjo-Sáez, Luis A. Álvarez-Sala-Walther and Luis A. López-Fernández.

*Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14447. <https://doi.org/10.3390/ijms241914447>

#### **Abstract:**

Vitamin D is an environmental factor related to multiple sclerosis that plays a significant role in immune regulation. TGF- $\beta$  is a superfamily of cytokines with an important dual effect on the immune system. TGF- $\beta$  inhibits the Th1 response while facilitating the preservation of regulatory T cells (FOXP3+) in an immune-regulatory capacity. However, when IL-6 is present, it stimulates the Th17 response. Our aim was to analyze the regulatory effect of vitamin D on the *in vivo* TGF- $\beta$  signaling pathway in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). A total of 21 patients with vitamin D levels < 30 ng/mL were recruited and supplemented with oral vitamin D. All patients were receiving disease-modifying therapy, with the majority being on natalizumab. Expression of *SMAD7*, *ERK1*, *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, and *BMP5* was measured in CD4+ lymphocytes isolated from peripheral blood at baseline and one and six months after supplementation. *SMAD7* was overexpressed at six months with respect to baseline and month one. *ERK1* was overexpressed at six months with respect to month one of treatment. No significant differences in expression were observed for the remaining genes. No direct correlation was found with serum vitamin D levels. *BMPRII* expression changed differentially in non-natalizumab- versus natalizumab-

treated patients. Changes were observed in the expression of *ERK1*, *BMP2*, and *BMP5* based on disease activity measured using the Rio-Score, *BMP2* in patients who had relapses, and *BMP5* in those whose EDSS worsened. Our results suggest indirect regulation of vitamin D in TGF- $\beta$  pathway genes in patients with RRMS.



Article

# Changes in the Expression of TGF-Beta Regulatory Pathway Genes Induced by Vitamin D in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis

Alberto Lozano-Ros <sup>1,\*</sup>, María L. Martínez-Ginés <sup>1</sup>, José M. García-Domínguez <sup>1</sup>, Sara Salvador-Martín <sup>2</sup>, Haydee Goicochea-Briceño <sup>1</sup>, Juan P. Cuello <sup>1</sup>, Ariana Meldaña-Rivera <sup>1</sup>, Yolanda Higuera-Hernández <sup>1</sup>, María Sanjurjo-Sáez <sup>2</sup>, Luis A. Álvarez-Sala-Walther <sup>3</sup> and Luis A. López-Fernández <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Neurología, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; mluisa.martinez@salud.madrid.org (M.L.M.-G.); jmanuel.garcia@sen.es (J.M.G.-D.); haydee.goicochea@salud.madrid.org (H.G.-B.); juanpablo.cuello@salud.madrid.org (J.P.C.); arimelda@ucm.es (A.M.-R.); yyhiguera@ucm.es (Y.H.-H.)

<sup>2</sup> Servicio de Farmacia, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; sara.salvador@iisgm.com (S.S.-M.); maria.sanjurjo@salud.madrid.org (M.S.-S.)

<sup>3</sup> Servicio de Medicina Interna, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; laalvare@ucm.es

\* Correspondence: alberto.lozano@salud.madrid.org (A.L.-R.); luis.lopez@iisgm.com (L.A.L.-F.)



**Citation:** Lozano-Ros, A.; Martínez-Ginés, M.L.; García-Domínguez, J.M.; Salvador-Martín, S.; Goicochea-Briceño, H.; Cuello, J.P.; Meldaña-Rivera, A.; Higuera-Hernández, Y.; Sanjurjo-Sáez, M.; Álvarez-Sala-Walther, L.A.; et al. Changes in the Expression of TGF-Beta Regulatory Pathway Genes Induced by Vitamin D in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14447. <https://doi.org/10.3390/ijms241914447>

Academic Editor: Elisabetta Coppi

Received: 19 July 2023

Revised: 20 September 2023

Accepted: 20 September 2023

Published: 22 September 2023

**Abstract:** Vitamin D is an environmental factor related to multiple sclerosis that plays a significant role in immune regulation. TGF- $\beta$  is a superfamily of cytokines with an important dual effect on the immune system. TGF- $\beta$  inhibits the Th1 response while facilitating the preservation of regulatory T cells (FOXP3+) in an immunoregulatory capacity. However, when IL-6 is present, it stimulates the Th17 response. Our aim was to analyze the regulatory effect of vitamin D on the in vivo TGF- $\beta$  signaling pathway in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). A total of 21 patients with vitamin D levels < 30 ng/mL were recruited and supplemented with oral vitamin D. All patients were receiving disease-modifying therapy, with the majority being on natalizumab. Expression of *SMAD7*, *ERK1*, *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, and *BMP5* was measured in CD4+ lymphocytes isolated from peripheral blood at baseline and one and six months after supplementation. *SMAD7* was overexpressed at six months with respect to baseline and month one. *ERK1* was overexpressed at six months with respect to month one of treatment. No significant differences in expression were observed for the remaining genes. No direct correlation was found with serum vitamin D levels. *BMPRII* expression changed differentially in non-natalizumab- versus natalizumab-treated patients. Changes were observed in the expression of *ERK1*, *BMP2*, and *BMP5* based on disease activity measured using the Rio-Score, *BMP2* in patients who had relapses, and *BMP5* in those whose EDSS worsened. Our results suggest indirect regulation of vitamin D in TGF- $\beta$  pathway genes in patients with RRMS.

**Keywords:** vitamin D; TGF- $\beta$  pathway; BMP signaling; multiple sclerosis



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease affecting the central nervous system (CNS). Its etiology is still unknown, although it is thought to be the result of immune dysregulation induced by both genetic and environmental factors [1]. The pathogenesis of this condition is mainly autoimmune, with the participation of both innate and acquired immunity. The immune response to CNS antigens is mediated by activated autoreactive CD4+ T cells, with contributions from other cells and immune system cytokines [2]. Of the various environmental factors related to the disease, vitamin D (VD) is

thought to play a major role in development and progression owing to its role in immune regulation [3,4].

In studies of MS and in the murine animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the presence of VD has been correlated with increased expression of anti-inflammatory cytokines (IL-4; IL-10) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a decrease in the expression of certain pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IL-17, and IFN- $\gamma$  [5], and modulation of the T cell response [6], thus highlighting its immunoregulatory role. VD performs its functions by interacting with its receptor (VDR), which is expressed extensively on cells of the immune system. After VD activates the VDR, it binds to specific DNA regions, leading to promotion or suppression of gene transcription [7].

TGF- $\beta$  is a superfamily of cytokines and growth factors involved in the processes of cell growth and differentiation in the immune system [8]. TGF- $\beta$  signaling has important anti-inflammatory effects, such as inhibiting cell proliferation mediated by IL-2 and IL-12, decreasing the production of tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxins, and intervening in the maintenance of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. However, in the presence of IL-6, it promotes differentiation toward Th17, a cell phenotype that plays an important role in the immunopathogenesis of EAE and MS [9–11].

Activation and phosphorylation of the TGF- $\beta$  type II receptor (TGF- $\beta$ RII) triggers R-SMAD proteins (SMAD2/3). These form a complex with the mediator Co-SMAD4, which translocates to the nucleus to regulate transcription of specific genes. Two inhibitory I-SMAD proteins (SMAD6 and SMAD7) run a negative feedback loop on TGF- $\beta$  signaling, by competing with R-SMADs for receptor binding, thus inhibiting their phosphorylation [10,11]. Apart from the SMAD pathway, TGF- $\beta$  signaling is carried out by other non-SMAD-dependent pathways (e.g., Ras-ERK, mitogen-activated protein kinase [MAPK], c-Jun N-terminal kinase [JNK], TAK-MKK3/6-p38) [12,13] and is modulated at several levels by regulatory proteins, such as activated STAT inhibitor proteins (PIAS), which are able to suppress SMAD3 transcriptional activity [14,15]. VD has been associated with the immunoregulatory functions of TGF- $\beta$ . It has demonstrated the ability to increase transcription factors that bind to the TGF- $\beta$  promoter, activate alternative pathways mediated by mitogen-activated protein kinase (MAPK), and modify the half-life of TGF- $\beta$  mRNA, thus suggesting a post-transcriptional mechanism. The precise direct or indirect mechanisms by which VD interacts with TGF- $\beta$  are still unclear [16].

The TGF- $\beta$  superfamily also includes bone morphogenetic proteins (BMPs), which are a group of growth factors whose functioning also depends on signaling pathways common to TGF- $\beta$  via SMAD- and non-SMAD-dependent pathways [17,18]. They have been linked to cell maintenance and differentiation processes in various tissues. In the CNS, they act primarily as promoters of astrocyte differentiation and suppressors of oligodendroglial differentiation [19]. They also play an important role in the immune system in T-cell differentiation and regulation of cellular and humoral responses [17,20]. BMP signaling has been shown to be altered in EAE and MS by promoting a pro-inflammatory response in the disease [21,22].

In this study, we aimed to analyze the regulatory effect of VD on TGF- $\beta$  signaling pathway gene expression in vivo in patients with relapsing-remitting MS (RRMS).

## 2. Results

### 2.1. Patient Characteristics

A total of 21 patients were included in the study. The median age of patients was 39 (IQR, 20–56) years, and most were women (76.2%). Natalizumab was the most common treatment (Table 1). Serum VD levels increased from baseline to six months.

**Table 1.** Patient characteristics.

Characteristic	RRMS (n = 21)
Median age, years (IQR, min–max)	39 (11.5, 20–56)
Sex	
Women n, (%)	16 (76.2%)
Men n, (%)	5 (23.8%)
Months from diagnosis to sample collection, Median (IQR, min–max)	95 (115.3, 15–272)
Type of disease-modifying treatment (n)	
Baseline–end	
Interferon beta-1a im	3–3
Glatiramer acetate	4–3
Teriflunomide	2–1
Dimethyl fumarate	3–3
Natalizumab	9–10
Alemtuzumab	0–1
Serum vitamin D levels (ng/mL) Median, IQR (min–max)	
T0	24.4, 5.5 (10.1–29.5)
T1	33.8, 11.2 (13.1–80.4)
T6	35.8, 6.9 (17.0–48.0)
EDSS Median, IQR (min–max) Baseline–end	1.0, 2.2 (0–6)
Rio-Score n, (%) Baseline–end	
0	10 (47.6%)–15 (71.4%)
1	7 (33.3%)–5 (23.8%)
2	2 (14.3%)–1 (4.8%)
3	1 (4.8%)–0 (0%)

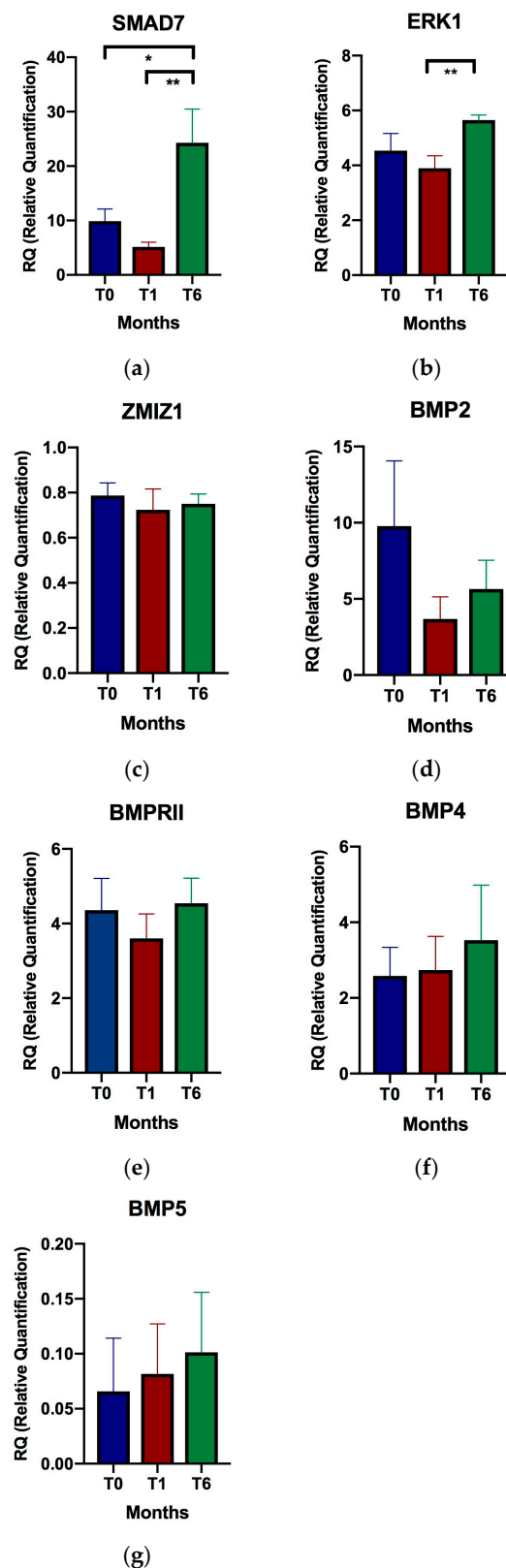
RRMS, relapsing–remitting multiple sclerosis; im, intramuscular; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation; EDSS, expanded disability status scale.

## 2.2. Gene Expression of TGF- $\beta$ Related Genes and Relationship with VD Supplementation

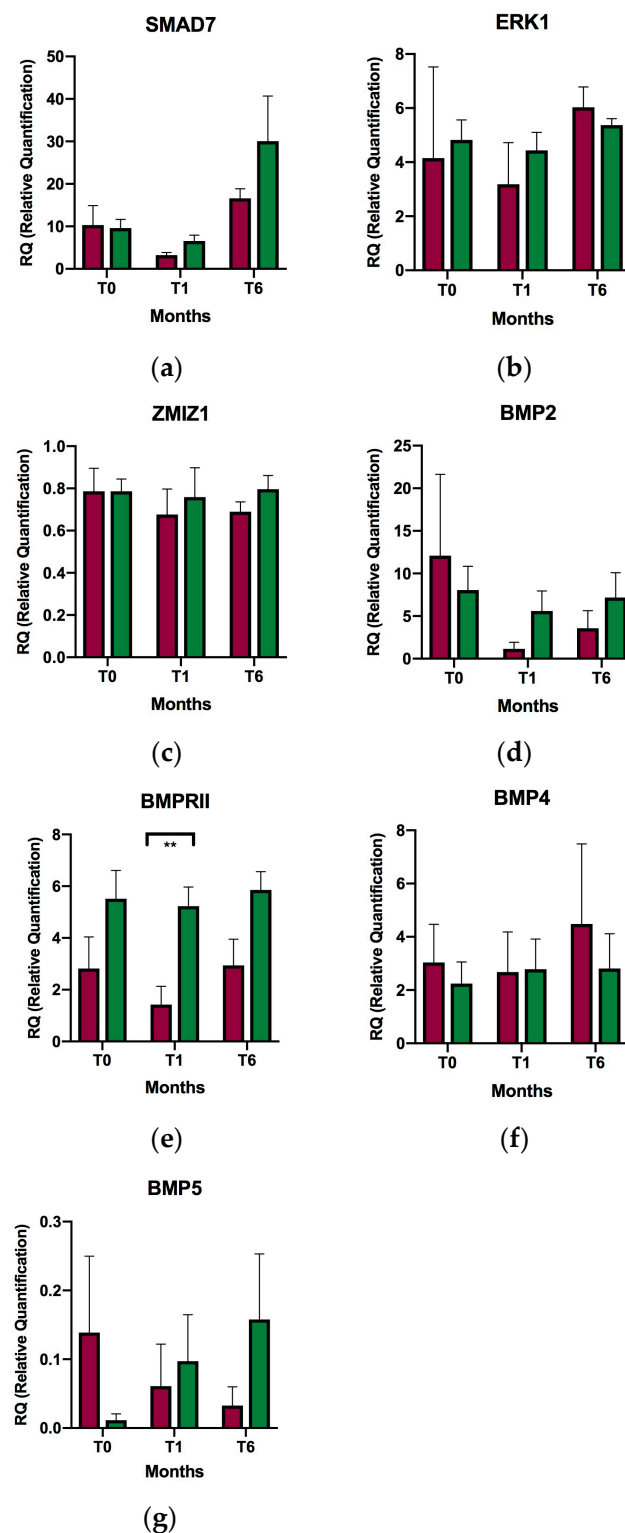
Analysis of TGF- $\beta$  related gene expression revealed that the mean expression of the *SMAD7* gene increased 3.66-fold ( $p$  value = 0.033) from baseline to six months of treatment, and 5.32-fold ( $p$  value = 0.008) from the first to the sixth month of treatment. The mean expression of *SMAD7* in the first month was lower than at baseline, although the difference was not significant. Increased mean expression of *ERK1* was also observed at six months compared to one month of supplementation (1.84-fold;  $p$  value = 0.002). No significant differences were found in the mean expression of *ZMIZ1*, *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, or *BMP5* at the study timepoints (Figure 1), although a trend toward overexpression of *BMP5* was observed at one month and six months of VD supplementation compared to baseline. No correlation was found between expression variables of the different study genes and serum VD levels. Individual expression data and variables used for comparison in all figures are provided in the Supplementary Material.

## 2.3. Gene Expression of TGF- $\beta$ Related Genes under Natalizumab Treatment and VD Supplementation

As natalizumab was the main treatment, mean changes in TGF- $\beta$  related gene expression were analyzed, specifically in this group of patients. The comparison revealed that only *BMPRII* was differentially expressed after one month of VD supplementation. Thus, *BMPRII* was overexpressed 3.66-fold in the non–natalizumab- versus natalizumab-treated group ( $p$  value = 0.001) (Table 1, Figure 2). In addition, a trend toward overexpression of *BMPRII* was observed in non–natalizumab-treated patients versus natalizumab-treated patients during follow-up (baseline, one month, and six months). However, it was only after one month that this difference became statistically significant.



**Figure 1.** Relative expression of selected genes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients at baseline, after one month of supplementation, and after six months of supplementation. (a) *SMAD7*; (b) *ERK1*; (c) *ZMIZ1*; (d) *BMP2*; (e) *BMPRII*; (f) *BMP4*; and (g) *BMP5*; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Relative quantification of expression is represented as the mean of relative individual expression value; the error bars indicate the standard error of the mean.



**Figure 2.** Relative expression of selected genes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients with and without natalizumab at baseline, after one month of supplementation, and after six months of supplementation. (a) *SMAD7*; (b) *ERK1*; (c) *ZMIZ1*; (d) *BMP2*; (e) *BMPRII*; (f) *BMP4*; and (g) *BMP5*; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation; Red, natalizumab; Green, no natalizumab. \*\*  $p < 0.01$ . Relative quantification of expression is represented as the mean of relative individual expression values; the error bars indicate the standard error of the mean.

In contrast, there was a trend toward decreased mean expression of *BMP5* from baseline to six months in natalizumab-treated patients, while in non-natalizumab-treated patients, the trend was toward increased mean expression. Nevertheless, these changes were not statistically significant.

#### 2.4. Gene Expression of TGF- $\beta$ Related Genes and Clinical-Radiological Disease Activity

The expression of genes related to inflammation could be associated with the clinical and radiological characteristics of affected patients. Therefore, we compared the group of patients whose Rio-Score improved or remained unchanged at one year of the study with those whose Rio-Score worsened and found a significant difference in the mean expression of *ERK1* at baseline (2.25-fold higher expression in the improvement or no change in Rio-Score group;  $p$  value = 0.045). Significant differences were also found in mean *BMP2* expression at baseline (7.44-fold higher expression in the worsening Rio-Score group;  $p$  value = 0.008) and after six months of supplementation (3.92-fold increased expression in the Rio-Score worsening group;  $p$  value = 0.023), and in mean *BMP5* expression at one month of supplementation (23-fold increased expression was observed in the worsening Rio-Score group;  $p$  value = 0.004) (Table 1, Figure 3). A trend toward increased expression of *BMPRII* after six months of supplementation was observed in the worsening group, and a trend toward increased expression of *SMAD7* was observed in both groups after six months of supplementation. However, these changes were not statistically significant.

A total of four patients experienced a relapse during the study. Comparison between patients who experienced a relapse and those who did not showed a significant difference in mean *BMP2* expression at baseline in the relapse group (5.94-fold;  $p$  value = 0.017) (Figure 4). A trend was also observed toward increased expression of *BMP5* at one month and *BMPRII* at one and six months in the group of patients who experienced a relapse. However, these changes were not statistically significant.

Comparison between the patients whose EDSS improved at one year of the study and those whose disease worsened or remained unchanged showed a significant difference in *BMP5* mean expression at baseline (15.55-fold higher in the EDSS improvement group;  $p$  value = 0.019) (Table 1, Figure 5). In contrast, the trend in expression seems to have been lower at one and six months in the EDSS improvement group (data not statistically significant).

A non-statistically significant trend toward overexpression of *BMPRII* was also observed in the worsening or no-change EDSS group during follow-up (baseline, one month, and six months).

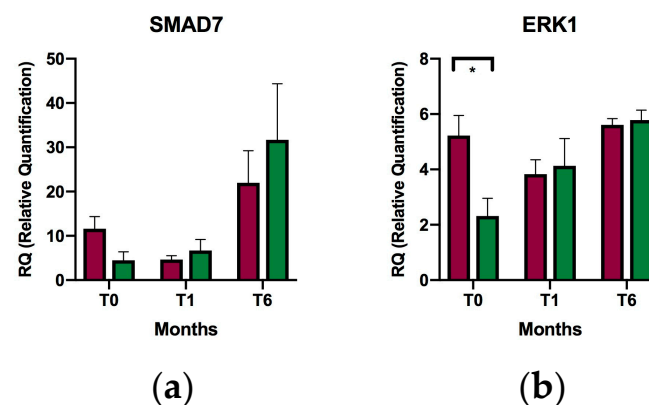
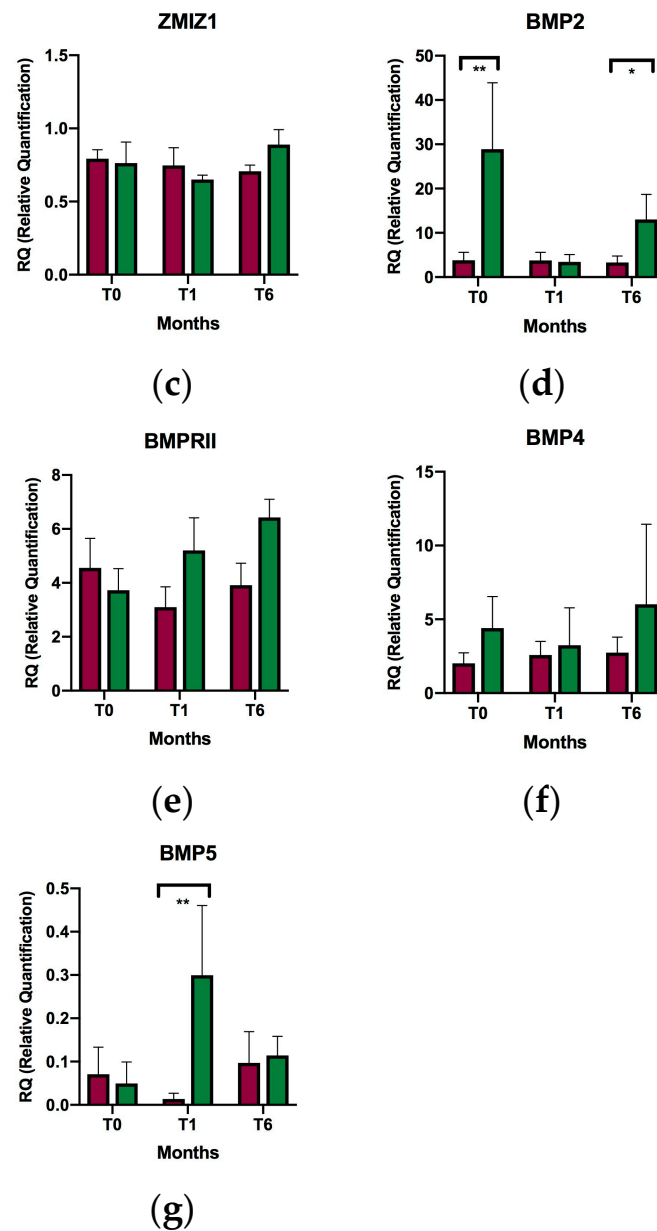
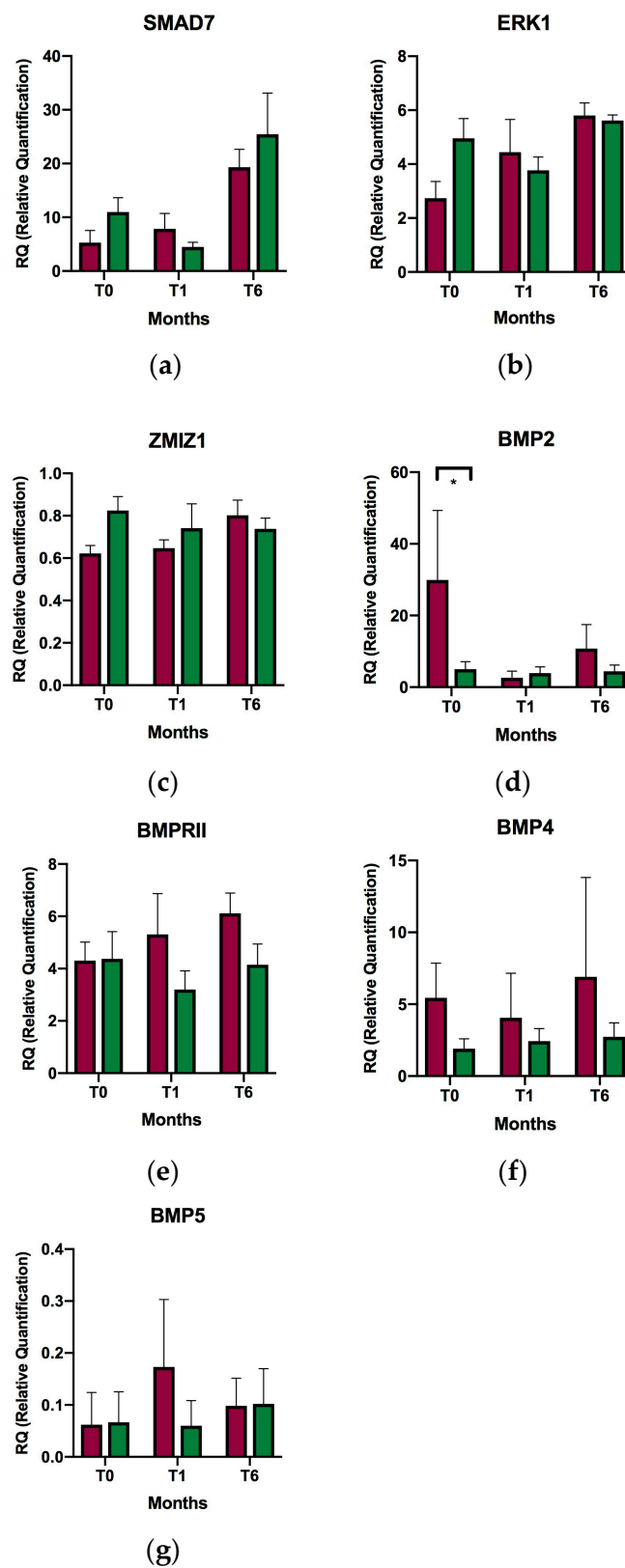


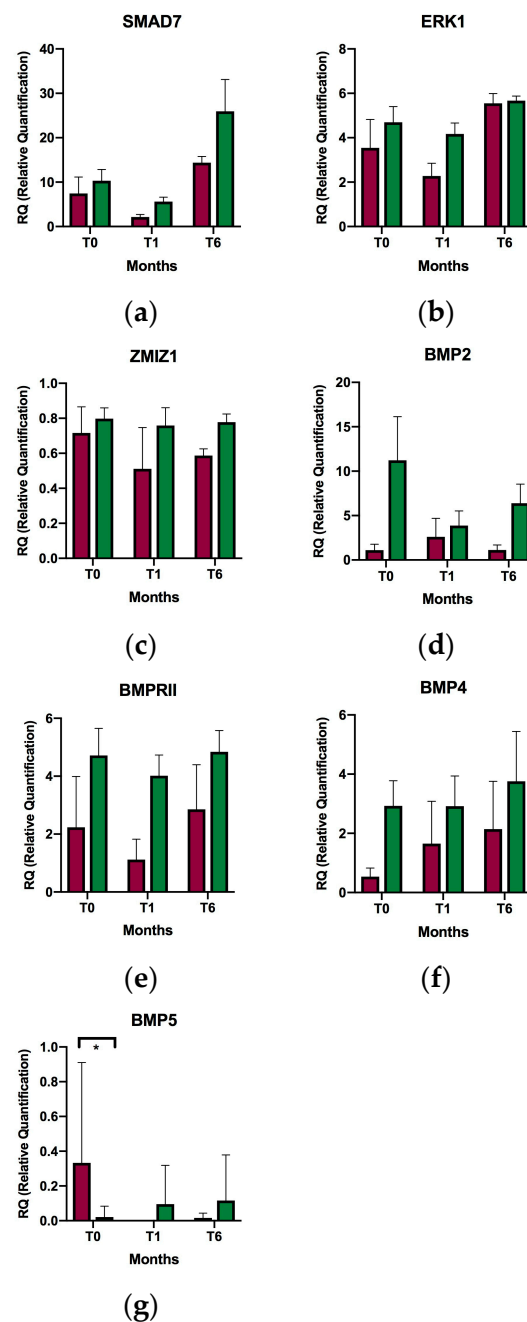
Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Relative expression of selected genes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients with improvement or no change in the Rio-Score versus worsening in the Rio-Score at baseline, after one month of supplementation, and after six months of supplementation. (a) *SMAD7*; (b) *ERK1*; (c) *ZMIZ1*; (d) *BMP2*; (e) *BMPRII*; (f) *BMP4*; and (g) *BMP5*; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation; Red, improvement or no change in the Rio-Score; Green, worsening in the Rio-Score. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Relative quantification of expression is represented as the mean of relative individual expression values; the error bars indicate the standard error of the mean.



**Figure 4.** Relative expression of selected genes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients with or without relapses of the disease at baseline, after one month of supplementation and after six months of supplementation. (a) *SMAD7*; (b) *ERK1*; (c) *ZMIZ1*; (d) *BMP2*; (e) *BMPRII*; (f) *BMP4*; and (g) *BMP5*; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation; Red, relapse; Green, no relapse. \*  $p < 0.05$ . Relative quantification of expression is represented as the mean of relative individual expression values; the error bars indicate the standard error of the mean.



**Figure 5.** Relative expression of selected genes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients with improvement in the EDSS versus worsening or no change in the EDSS at baseline, after one month of supplementation, and after six months of supplementation. (a) *SMAD7*; (b) *ERK1*; (c) *ZMIZ1*; (d) *BMP2*; (e) *BMPRII*; (f) *BMP4*; and (g) *BMP5*; T0, baseline; T1, after one month of supplementation; T6, after six months of supplementation; Red, improvement in the EDSS; Green, worsening or no change in the EDSS. \*  $p < 0.05$ . Relative quantification of expression is represented as the mean of relative individual expression values; the error bars indicate the standard error of the mean.

### 3. Discussion

VD is an environmental factor that is intimately related to the development of MS [23]. It plays an immunoregulatory role by activating various pathways. One of these is the TGF- $\beta$  pathway, which, through its different cytokines and growth factors, promotes mainly anti-inflammatory functions, such as the generation and maintenance of regulatory T cells or the inhibition of pro-inflammatory cytokines [24,25]. However, TGF- $\beta$  is also able to promote differentiation toward Th17, a cell phenotype involved in the pathogenesis of MS

and EAE [26,27]. To carry out these functions, TGF- $\beta$  uses different signaling pathways. These may depend or not on SMAD proteins [28–30], which in turn are regulated at different levels by various regulatory proteins. Therefore, knowledge of the changes caused by VD supplementation in the expression of genes involved in this pathway is essential if we are to understand the molecular effects of this treatment and to establish future biomarkers of response to it.

In this study, CD4<sup>+</sup> T cells extracted from peripheral blood of RRMS patients, both before and after VD supplementation according to standard clinical practice, were examined for changes in the expression of TGF- $\beta$ -related genes.

We found significant changes in *SMAD7* expression at six months from baseline and at one month from the start of supplementation. We also found significant differences in *ERK1* expression at six months compared to the first month after initiation of supplementation. *SMAD7* exerts a negative feedback effect on the SMAD pathway of TGF- $\beta$  [31,32], whereas *ERK1* is part of the non-SMAD pathway [8,9,11]. These findings suggest that TGF- $\beta$  is likely to carry out its functions primarily through the non-SMAD pathway, while the canonical SMAD pathway is inhibited due to overexpression of *SMAD7* under the influence of VD. An EAE study in mice revealed that when T cells lacked TGF- $\beta$ RII, they did not differentiate to Th17, but when they were treated with a TGF- $\beta$ R1 kinase inhibitor (SB-431542) or overexpressed *Smad7*, the Th17 population was maintained through activation of non-SMAD-dependent genes [13]. We did not find an association between VD levels and the expression of these genes, thus suggesting that VD would be regulating them not directly, but in a more complex way, probably by acting on other, different pathways that indirectly end up favoring overexpression of *SMAD7* and *ERK1*. In this sense, other studies have demonstrated that VD can activate alternative non-SMAD pathways of TGF- $\beta$  by activating transcription factors that bind to the TGF- $\beta$  promoter or even influencing its post-transcriptional regulation [16]. However, in another study, again in mice, the authors found that the active form of VD (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) promoted *Smad3* expression and inhibited *Smad7* expression during differentiation to Th17 [33]. In humans with MS supplemented with VD, one study found significant differences in expression in genes related to the Th17 population [34]. Another study, also in humans with MS who received VD, found increased expression of IL-10 but not TGF- $\beta$ 1 in treated patients [35]. The influence of VD on gene expression may change depending on the cell type of the immune system, as shown in another work in MS patients [36]. Despite the difference in study models, the mechanism by which VD regulates TGF- $\beta$  is still unclear.

Th17 facilitates disruption of the blood–brain barrier, thus enabling the transit of inflammatory cells into the CNS [26]. IL-17A and other Th17-responsive cytokines have been detected in CNS lesions in both MS and EAE [37], although it is difficult to access the CNS compartment in MS [10]. Therefore, we investigated whether the mechanism of action of disease-modifying treatment (DMT) would influence TGF- $\beta$  gene expression. In our study, all patients were receiving DMT, nine of them with natalizumab. Natalizumab is a monoclonal antibody directed against the  $\alpha$ -chain of the VLA-4 integrin and is a very potent inhibitor of cell migration into tissues, including the CNS. It reduces relapses and active lesions very effectively in the MRI of RRMS patients [38,39]. Of all of the genes studied, significant differences in *BMPRII* expression were only found one month after initiation of supplementation in those patients who were not receiving natalizumab. A trend toward overexpression of *BMPRII* was observed in non-natalizumab-treated patients compared to natalizumab-treated patients, both at baseline and after six months. With respect to *BMP5*, we observed a decreasing trend in mean expression from baseline to six months in natalizumab-treated patients versus an increasing trend in non-natalizumab-treated patients. However, these changes were not statistically significant. The fact that there is an effective blockade of cell entry into the CNS depending on treatment with natalizumab and, therefore, apparently different CNS compartments, does not seem to be a determinant in modifying TGF- $\beta$  gene expression, except in *BMPRII*. Nonetheless, it cannot be excluded that the other mechanisms of action of DMT will affect gene expression of TGF- $\beta$  in regard

to VD. This finding would be in line with other works, such as a study in which the authors measured expression of BMP genes in MS lesions and found increased expression of *BMP2*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP7*, *BMPRII*, and *pSMAD1/5/8* in astrocytes, microglia/macrophages, and neurons [22]. In another study, in this case in EAE, overexpression of *Bmp4*, *Bmp6*, and *Bmp7* was observed in the lumbar spinal cord of mice with active EAE [40].

The Rio-Score is an index created from a combination of relapse data, sustained EDSS changes, and MRI lesions that is used to assess the degree of therapeutic response to interferon-beta in RRMS patients [41–43]. In our case, we used the Rio-Score as a simple measure of the clinical-radiological characteristics of the disease to assess whether they would influence gene expression in the study. Significantly higher expression of *ERK1* was found at baseline, normalizing at one month and six months after the initiation of supplementation in patients whose Rio-Score improved or remained unchanged at one year after the study. The higher expression of *ERK1* at baseline would suggest activation of the non-SMAD pathway of TGF- $\beta$  [12,13], which normalized as soon as patients reached sufficiently high serum values of VD after one month of supplementation. Thus, the anti-inflammatory effects of TGF- $\beta$  are mediated through the SMAD protein-dependent pathway. In patients with a worsening Rio-Score at one year, expression of *BMP2* was higher at baseline and six months, and that of *BMP5* was increased at one month, indicating that BMP signaling is altered in MS patients [17], although its expression does not seem to be related to VD levels and did not change after serum levels returned to normal. Along the same lines, we also observed overexpression of baseline *BMP2* in patients whose disease relapsed and overexpression of *BMP5* in patients whose EDSS improved, indicating dysregulation of BMP signaling in MS patients. One study found increased *BMP2* expression in the serum of untreated RRMS patients, and its levels correlated with those of *BMP4* and *BMP5* [44]. BMPs are multifunctional proteins involved in cell differentiation processes, such as astroglialogenesis, oligodendroglialogenesis, and neurogenesis [45–48]. BMP signaling also has effects on immune system differentiation, facilitating, together with TGF- $\beta$ , the differentiation of FOXP3+ regulatory T cells [49]. In MS patients, this dysregulation of BMP signaling leads to proliferation of pro-inflammatory cell lines, thus promoting disease activity [21].

Given the lack of consensus on the dosage or the time of administration, VD supplementation was prescribed according to standard clinical practice criteria. In our study, there were no withdrawals from treatment or related adverse effects. This observation is in line with other published studies, which state that VD supplementation is safe and tolerable with immunological benefits in MS patients [6]. Data are currently available from two large clinical trials examining VD supplementation in MS (SOLAR and CHOLINE). While neither study met its primary endpoints (no evidence of disease activity [NEDA-3] at 48 weeks in SOLAR and annualized relapse rate at 96 weeks in CHOLINE), both showed effects on some secondary endpoints [50–52]. Although there are discrepancies between observational studies and clinical trials with VD, the evidence would still support the recommendation to prescribe supplementation in MS patients with insufficient VD levels [53,54].

Munger et al. studied changes in global gene expression in the blood cells of MS patients who received VD supplementation, suggesting that the activity of MS is affected by unbalanced VD-related gene expression [55]. The differences with our study are that, first, we focused on the changes in TGF- $\beta$  signaling, whereas Munger et al. provided a whole transcriptomic profile. Second, we measured expression in T lymphocytes, whereas Munger et al. used whole blood. And third, patients in the Munger study were treated with interferon  $\beta$ -1b. However, our results also suggest that regulation of VD-expressed genes may affect the activity of MS.

A limitation of the study may be the lack of a healthy control group to measure gene expression changes after VD supplementation. The expression of *SMAD7* increased by a factor of 3.6 in multiple sclerosis (MS) patients after six months of VD supplementation. Similarly, *SMAD7* expression exhibited a 2.3-fold increase in healthy donors compared

to MS patients [10]. While our study did not incorporate a healthy control group, our findings suggest a restoration of "normal" *SMAD7* levels after six months of VD supplementation [10]. No comparisons are available for the remaining genes analyzed in this study.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patients

Patients were recruited and samples taken at the Neurology Department of Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain between 2016–2017. The inclusion criterion was a diagnosis of RRMS according to the 2010 McDonald criteria with or without DMT in patients with insufficient VD levels (<30 ng/mL). Patients received VD supplement (calcifediol 0.266 mg) at a dosage of 1 ampoule orally per month. The exclusion criteria included relapse or corticosteroid treatment in the previous 30 days and contraindication to VD supplementation. In Figure 1, a healthy control group supplemented with vitamin D (VD) was not included. This decision was based on our group's previous data, where we observed initial differences in gene expression for *SMAD7* between healthy donors and individuals with multiple sclerosis (MS) [10]. Therefore, including such differences could potentially obscure any effects of vitamin D on gene expression in healthy donors. Relapses were defined as new symptoms or worsening of pre-existing neurological symptoms lasting more than 24 h after a period of 30 days of improvement or stability in the absence of fever or infection. Patients signed a written informed consent form. This study followed the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Hospital General Universitario Gregorio Marañón (234/16).

### 4.2. Isolation and Culture of CD4+ T Cells

Blood samples (20 mL) were drawn in EDTA anticoagulant tubes at baseline and 1 month and 6 months after initiation of VD supplementation. Samples were processed immediately after collection under sterile conditions. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll gradient as described in [56]. CD4+ T-lymphocyte subtypes were negatively selected using the DynaBeads<sup>®</sup> Untouched<sup>™</sup> Human CD4 T Cells kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Cells were counted, homogenized in Ribozol (Amresco, Solon, OH, USA), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in pellet form until RNA extraction.

### 4.3. RNA Isolation and cDNA Extraction

RNA from CD4+ T lymphocytes was isolated using the Ribozol Plus RNA purification kit (Amresco) following the manufacturer's instructions. The concentration of the RNA obtained was quantified using spectrophotometry in a Quawell Q5000 device (Quawell Technology, Sunnyvale, CA, USA), and its integrity was verified in a 2100 Bioanalyzer device (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the RNA 6000 kit (Agilent). All RNAs had an integrity number (RIN)  $\geq 8$  and were, therefore, used for semi-quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

### 4.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Candidate genes representative of the different TGF- $\beta$  pathways were selected. *SMAD7* was selected as a regulatory gene for the canonical SMAD pathway, *ERK1* as a representative gene for the non-SMAD pathway, *ZMIZ1* as a regulatory gene for PIAS expression, and *BMPs* as members of the TGF- $\beta$  superfamily. We selected *BMP2*, *BMPRII*, *BMP4*, and *BMP5* for their increased expression in the MS lesions assessed in previous studies. Changes in selected genes were analyzed in 21 RRMS patients at baseline and one month and six months after the start of VD supplementation. The cDNAs were generated from 500 ng of RNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Invitrogen) in 20  $\mu\text{L}$  of final volume at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h. The enzyme was inactivated at  $85^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Relative quantification of gene expression was performed using qRT-PCRs in triplicate with 2  $\mu\text{L}$  of cDNA per well (1/10 dilution), 1  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix

(Roche Applied Science, Penzberg, Germany), and 0.04  $\mu\text{M}$  of oligonucleotides specific for *SMAD7* (F-ACCCGATGGATTTTCTCAA; R-AGGGGCCAGATAATTCGTTC), *ERK1* (F-CCCTAGCCCAGACAGACATC; R-GCACAGTGCCATTTTCTAACAGT), *ZMIZ1* (F-TTAGAGGGTCAGGCCGAGC; R-TCGGGAAGGAGATCCAGCGAA), *BMP2* (F-TCCACATGAAGAATCTTTG; R-TAATTCGGTGATGGAAACTG), *BMPRII* (F-CCCCTCCTACTCTCCT; R-CGCAGAACAACCGTGAGAG), *BMP4* (F-CTGCAACCGTTCAGAGGTC; R-TGCTCGGGATGGCACTAC), *BMP5* (F-ATGGCAGGACTGGATTATAG; R-AGAGTCTGA ACTATAGCGTG), and *GAPDH* (F-AGCCACATCGCTCAGACAC; R-GCCCAATACGACC AAATCC). PCR reactions were performed on a StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative expression of the genes analyzed was quantified using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method with StepOnePlus v2.3 software (Applied Biosystems). The *GAPDH* gene was used to normalize expression.

#### 4.5. Clinical-Radiological Disease Activity

Clinical-radiological disease activity was measured at baseline and one year after the start of supplementation using the Rio-Score, which combines relapse, EDSS, and magnetic resonance imaging (MRI) criteria. The relapse criterion scored one point if the patient had  $\geq 1$  relapse per year. The EDSS criterion scored one point if the patient had an increase of  $\geq 1$  point on the EDSS scale, maintained for at least 6 months and confirmed at 1 year of the study. The MRI criterion scored one point if the patient had  $>2$  active lesions (with respect to a previous annual MRI), defined as new or T2-enhancing lesions, plus the number of gadolinium-enhancing T1 lesions. The Rio-Score value was between 0 and 3. An increase in the Rio-Score value at 1 year compared to baseline was considered a deterioration in the Rio-Score, whereas a decrease in the value at 1 year compared to baseline was considered an improvement in the Rio-Score. Alternatively, an increase in the EDSS score at 1 year compared to baseline was considered a deterioration in the EDSS, while a decrease in the score at 1 year compared to baseline was considered an improvement in the EDSS.

#### 4.6. Statistical Analysis

For qRT-PCR, relative expression was analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method with StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). Relative quantification was measured using Expression Suite software v1.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). GraphPad Prism (v.8, Irvine, CA, USA) software was used for expression graphing. ANOVA and a paired *t* test were performed to identify differentially expressed genes. The Pearson correlation was used to study the association between variables. A *p* value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The clinical-radiological activity variables were analyzed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 5. Conclusions

VD indirectly regulates the in vivo expression of genes related to the TGF- $\beta$  signaling pathway in RRMS patients. Increased expression of *SMAD7* and *ERK1* suggests that VD could affect both SMAD and non-SMAD signaling pathways, which are critical for the dual functions of TGF- $\beta$  in the immune system and in MS. Knowledge of the mechanisms of action of VD may yield biomarkers of response. Our study could have been limited by the impact of DMT mechanisms of action on gene expression and the evaluation of other subtypes of peripheral blood mononuclear cells. Further studies in larger cohorts are needed to elucidate the mechanisms by which VD exerts this regulation.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241914447/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.L.-R., J.M.G.-D. and L.A.L.-F.; methodology, A.L.-R. and L.A.L.-F.; formal analysis, A.L.-R., S.S.-M. and L.A.L.-F.; data curation, A.L.-R., J.M.G.-D., M.L.M.-G., H.G.-B., S.S.-M., J.P.C., A.M.-R., Y.H.-H., M.S.-S. and L.A.Á.-S.-W.; writing—original draft preparation,

A.L.-R. and L.A.L.-F.; writing—review and editing, all. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded through a 2016 research grant by Gregorio Marañón Health Research Institute (II-POSTMIR-2016).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hospital General Universitario Gregorio Marañón (protocol code 234/16, 13 September 2016).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data available in Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We are particularly grateful to the study patients for their participation.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analysis, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Garg, N.; Smith, T.W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* **2015**, *5*, e00362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hemmer, B.; Kerschensteiner, M.; Korn, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 406–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ascherio, A.; Munger, K.L.; White, R.; Köchert, K.; Simon, K.C.; Polman, C.H.; Freedman, M.S.; Hartung, H.-P.; Miller, D.H.; Montalbán, X.; et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* **2014**, *71*, 306–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lucas, R.M.; Gorman, S.; Geldenhuys, S.; Hart, P.H. Vitamin D and immunity. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, 118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Smolders, J.; Thewissen, M.; Peelen, E.; Menheere, P.; Tervaert, J.W.C.; Damoiseaux, J.; Hupperts, R. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6635. [[CrossRef](#)]
6. Sotirchos, E.S.; Bhargava, P.; Eckstein, C.; Van Haren, K.; Baynes, M.; Ntranos, A.; Gocke, A.; Steinman, L.; Mowry, E.M.; Calabresi, P.A. Safety and immunologic effects of high-vs low-dose cholecalciferol in multiple sclerosis. *Neurology* **2016**, *86*, 382–390. [[CrossRef](#)]
7. Christakos, S.; Dhawan, P.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 365–408. [[CrossRef](#)]
8. Heldin, C.H.; Moustakas, A. Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 21–36. [[CrossRef](#)]
9. Meoli, E.M.; Oh, U.; Grant, C.W.; Jacobson, S. TGF- $\beta$  signaling is altered in the peripheral blood of subjects with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *230*, 164–168. [[CrossRef](#)]
10. Abarca-Zabalía, J.; García, M.I.; Ros, A.L.; Marín-Jiménez, I.; Martínez-Ginés, M.L.; López-Cauce, B.; Martín-Barbero, M.L.; Salvador-Martín, S.; Sanjurjo-Saez, M.; García-Domínguez, J.M.; et al. Differential expression of SMAD genes and S1PR1 on circulating cd4+ t cells in multiple sclerosis and crohn’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 676. [[CrossRef](#)]
11. Kamato, D.; Burch, M.L.; Piva, T.J.; Rezaei, H.B.; Rostam, M.A.; Xu, S.; Zheng, W.; Little, P.J.; Osman, N. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: Role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2017–2024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Moustakas, A.; Heldin, C.-H. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3573–3584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hasan, M.; Neumann, B.; Hauptelshofer, S.; Stahlke, S.; Claudio Fantini, M.; Angstwurm, K.; Bogdahn, U.; Kleiter, I. Activation of TGF- $\beta$ -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 662–672. [[CrossRef](#)]
14. Li, X.; Thyssen, G.; Beliakov, J.; Sun, Z. The Novel PIAS-like Protein hZimp10 Enhances Smad Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23748–23756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fewings, N.L.; Gatt, P.N.; McKay, F.C.; Parnell, G.P.; Schibeci, S.D.; Edwards, J.; Basuki, M.A.; Goldinger, A.; Fabis-Pedrini, M.J.; Kermod, A.G.; et al. The autoimmune risk gene ZMIZ1 is a vitamin D responsive marker of a molecular phenotype of multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **2017**, *78*, 57–69. [[CrossRef](#)]
16. Shirvani-Farsani, Z.; Behmanesh, M.; Mohammadi, S.M.; Moghadasi, A.N. Vitamin D levels in multiple sclerosis patients: Association with TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ RI, and TGF- $\beta$ RII expression. *Life Sci.* **2015**, *134*, 63–67. [[CrossRef](#)]
17. Eixarch, H.; Calvo-Barreiro, L.; Montalbán, X.; Espejo, C. Bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis: Role in neuroinflammation. *Brain. Behav. Immun.* **2018**, *68*, 1–10. [[CrossRef](#)]
18. Sotiropoulos, M.G.; Chitnis, T. Opposing and potentially antagonistic effects of BMP and TGF- $\beta$  in multiple sclerosis: The “Yin and Yang” of neuro-immune Signaling. *J. Neuroimmunol.* **2020**, *347*, 577358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mausner-Fainberg, K.; Benhamou, M.; Golan, M.; Kimelman, N.B.; Danon, U.; Marom, E.; Karni, A. Specific Blockade of Bone Morphogenetic Protein-2/4 Induces Oligodendrogenesis and Remyelination in Demyelinating Disorders. *Neurotherapeutics* **2021**, *18*, 1798–1814. [[CrossRef](#)]

20. Voumvourakis, K.I.; Antonelou, R.C.; Kitsos, D.K.; Stamboulis, E.; Tsiodras, S. TGF- $\beta$ /BMPs: Crucial crossroad in neural autoimmune disorders. *Neurochem. Int.* **2011**, *59*, 542–550. [[CrossRef](#)]
21. Mausner-Fainberg, K.; Urshansky, N.; Regev, K.; Auriel, E.; Karni, A. Elevated and dysregulated bone morphogenic proteins in immune cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *264*, 91–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Costa, C.; Eixarch, H.; Martínez-Sáez, E.; Calvo-Barreiro, L.; Calucho, M.; Castro, Z.; Ortega-Aznar, A.; Ramón y Cajal, S.; Montalban, X.; Espejo, C. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Multiple Sclerosis Lesions. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 665–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sundström, P.; Salzer, J. Vitamin D and multiple sclerosis—from epidemiology to prevention. *Acta Neurol. Scand.* **2015**, *132*, 56–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Deluca, H.F.; Cantorna, M.T. Vitamin D: Its role and uses in immunology 1. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579–2585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lysandropoulos, A.P.; Jaquíery, E.; Jilek, S.; Pantaleo, G.; Schluep, M.; Du Pasquier, R.A. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *233*, 240–244. [[CrossRef](#)]
26. Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B.; Prat, A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1173–1175. [[CrossRef](#)]
27. Mangan, P.R.; Harrington, L.E.; O’Quinn, D.B.; Helms, W.S.; Bullard, D.C.; Elson, C.O.; Hatton, R.D.; Wahl, S.M.; Schoeb, T.R.; Weaver, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **2006**, *441*, 231–234. [[CrossRef](#)]
28. Mirshafiey, A.; Mohsenzadegan, M. TGF- $\beta$  as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 929–936. [[CrossRef](#)]
29. Kleiter, I.; Song, J.; Lukas, D.; Hasan, M.; Neumann, B.; Croxford, A.L.; Pedré, X.; Hövelmeyer, N.; Yogev, N.; Mildner, A.; et al. Smad7 in T cells drives T helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **2010**, *133*, 1067–1081. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Y.E. Non-Smad signaling pathways of the TGF- $\beta$  family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022129. [[CrossRef](#)]
31. Budi, E.H.; Duan, D.; Derynck, R. Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 658–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Akhurst, R.J.; Hata, A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 790–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nanduri, R.; Mahajan, S.; Bhagyaraj, E.; Sethi, K.; Kalra, R.; Chandra, V.; Gupta, P. The active form of vitamin D transcriptionally represses Smad7 signaling and activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) to inhibit the differentiation of an inflammatory T helper cell subset and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 12222–12236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Naghavi Gargari, B.; Behmanesh, M.; Shirvani Farsani, Z.; Pahlevan Kakhki, M.; Azimi, A.R. Vitamin D supplementation up-regulates IL-6 and IL-17A gene expression in multiple sclerosis patients. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 414–419. [[CrossRef](#)]
35. Farsani, Z.S.; Behmanesh, M.; Sahraian, M.A. Interleukin-10 but not transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression is up-regulated by vitamin D treatment in multiple. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *350*, 18–23. [[CrossRef](#)]
36. Kim, D.; Witt, E.E.; Schubert, S.; Sotirchos, E.; Bhargava, P.; Mowry, E.M.; Sachs, K.; Bilen, B.; Steinman, L.; Awani, A.; et al. Peripheral T-Cells, B-Cells, and Monocytes from Multiple Sclerosis Patients Supplemented with High-Dose Vitamin D Show Distinct Changes in Gene Expression Profiles. *Nutrients* **2022**, *14*, 4737. [[CrossRef](#)]
37. Waisman, A.; Hauptmann, J.; Regen, T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 625–637. [[CrossRef](#)]
38. Khoy, K.; Mariotte, D.; Defer, G.; Petit, G.; Toutirais, O.; Le Mauff, B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 549842. [[CrossRef](#)]
39. Clerico, M.; Artusi, C.A.; Liberto, A.D.; Rolla, S.; Bardina, V.; Barbero, P.; De Mercanti, S.F.; Durelli, L. Natalizumab in Multiple Sclerosis: Long-Term Management. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 940. [[CrossRef](#)]
40. Ara, J.; See, J.; Mamontov, P.; Hahn, A.; Bannerman, P.; Pleasure, D.; Grinspan, J.B. Bone morphogenetic proteins 4, 6, and 7 are up-regulated in mouse spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 125–135. [[CrossRef](#)]
41. Río, J.; Nos, C.; Tintoré, M.; Téllez, N.; Galán, I.; Pelayo, R.; Comabella, M.; Montalban, X. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* **2006**, *59*, 344–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Río, J.; Castelló, J.; Rovira, A.; Tintoré, M.; Sastre-Garriga, J.; Horga, A.; Nos, C.; Comabella, M.; Aymerich, X.; Montalbán, X. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult. Scler.* **2009**, *15*, 848–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sormani, M.P.; Río, J.; Tintorè, M.; Signori, a.; Li, D.; Cornelisse, P.; Stubinski, B.; Stromillo, M.L.; Montalban, X.; De Stefano, N. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2013**, *19*, 605–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Penn, M.; Mausner-Fainberg, K.; Golan, M.; Karni, A. High serum levels of BMP-2 correlate with BMP-4 and BMP-5 levels and induce reduced neuronal phenotype in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2017**, *310*, 120–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Grinspan, J.B.; Edell, E.; Carpio, D.F.; Beesley, J.S.; Lavy, L.; Pleasure, D.; Golden, J.A. Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J. Neurobiol.* **2000**, *43*, 1–17. [[CrossRef](#)]

46. Mabie, P.C.; Mehler, M.F.; Marmur, R.; Papavasiliou, A.; Song, Q.; Kessler, J.A. Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 4112–4120. [[CrossRef](#)]
47. Colak, D.; Mori, T.; Brill, M.S.; Pfeifer, A.; Falk, S.; Deng, C.; Monteiro, R.; Mummery, C.; Sommer, L.; Götz, M. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenetic protein signaling in stem cells. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 434–446. [[CrossRef](#)]
48. Coskun, V.; Venkatraman, G.; Yang, H.; Rao, M.S.; Luskin, M.B. Retroviral manipulation of the expression of bone morphogenetic protein receptor Ia by SVZa progenitor cells leads to changes in their p19(INK4d) expression but not in their neuronal commitment. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **2001**, *19*, 219–227. [[CrossRef](#)]
49. Lu, L.; Ma, J.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, F.; Yu, J.; He, G.; Xu, B.; Brand, D.D.; Horwitz, D.A.; et al. Synergistic effect of TGFbeta superfamily members on the induction of FoxP3+ regulatory cells. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 142–152. [[CrossRef](#)]
50. Hupperts, R.; Smolders, J.; Vieth, R.; Holmøy, T.; Marhardt, K.; Schlupe, M.; Killestein, J.; Barkhof, F.; Beelke, M.; Grimaldi, L.M.E. Randomized trial of daily high-dose Vitamin D3 in patients with RRMS receiving subcutaneous interferon  $\beta$ -1a. *Neurology* **2019**, *93*, E1906–E1916. [[CrossRef](#)]
51. Smolders, J.; Hupperts, R.; Barkhof, F.; Grimaldi, L.M.E.; Holmoy, T.; Killestein, J.; Rieckmann, P.; Schlupe, M.; Vieth, R.; Hostalek, U.; et al. Efficacy of vitamin D3 as add-on therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving subcutaneous interferon  $\beta$ -1a: A Phase II, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J. Neurol. Sci.* **2011**, *311*, 44–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Camu, W.; Lehert, P.; Pierrot-Deseilligny, C.; Hautecoeur, P.; Besserve, A.; Deleglise, A.S.J.; Payet, M.; Thouvenot, E.; Souberbielle, J.C. Cholecalciferol in relapsing-remitting MS: A randomized clinical trial (CHOLINE). *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflamm.* **2019**, *6*, e597. [[CrossRef](#)]
53. Smolders, J.; Torkildsen, Ø.; Camu, W.; Holmøy, T. An Update on Vitamin D and Disease Activity in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2019**, *33*, 1187–1199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sîrbe, C.; Rednic, S.; Grama, A.; Pop, T.L. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Munger, K.L.; Köchert, K.; Simon, K.C.; Kappos, L.; Polman, C.H.; Freedman, M.S.; Hartung, H.P.; Miller, D.H.; Montalbán, X.; Edan, G.; et al. Molecular mechanism underlying the impact of vitamin D on disease activity of MS. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2014**, *1*, 605–617. [[CrossRef](#)]
56. De Andres, C.; García, M.I.; Goicoechea, H.; Martínez-Ginés, M.L.; García-Domínguez, J.M.; Martín, M.L.; Romero-Delgado, F.; Benguría, A.; Sanjurjo, M.; López-Fernández, L.A. Genes differentially expressed by methylprednisolone in vivo in CD4 T lymphocytes from multiple sclerosis patients: Potential biomarkers. *Pharmacogenomics J.* **2018**, *18*, 98–105. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.