



## Inmunoregulación mediada por Calcitriol

Alberto Pinzón, MD. Laboratorio de Fisiología Molecular Instituto de Inmunología Hospital San Juan de Dios, Bogotá. Adriana Bermeo, MD. Hospital Departamental Rivera, Huila. Egresados Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, Jean Paul Vernot. Biólogo. PhD. Profesor Asistente Departamento de Ciencias Fisiológicas Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia. Investigador Laboratorio de Fisiología Molecular Instituto de Inmunología Hospital San Juan de Dios, Bogotá.

### SUMMARY

The classical role of calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihydroxivitamin D<sub>3</sub>) on calcium homeostasis is rather well known. Recent findings, of the calcitriol receptor on monocytes, activated lymphocytes and other cell lines, and the ectopical and localised hormone production by macrophages, suggest that this hormone is playing a new and important role in the modulation of immunological responses. These data support the concept that this hormone, first considered to be an immunosuppressor, could activate, as well as suppress, the immune function, depending on the lymphocyte activation mechanisms and the immunological microenvironment. The clinical information available and the *in vivo* and *in vitro* experimental evidence, support the concept of an immunoregulatory role for calcitriol. Hence the hormone should be considered a therapeutical immunomodulator

### RESUMEN

El papel clásico endocrino del calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>) en la homeostasis del calcio es bien conocido. Los hallazgos relativamente recientes de la presencia del receptor de calcitriol en monocitos, linfocitos y diversas líneas celulares, y el hallazgo de la producción ectópica y localizada del calcitriol por los macrófagos, sugiere un papel importante de esta vitamina/hormona en eventos de inmunoregulación. A partir de la nue-

va evidencia experimental, es claro, a diferencia de los planteamientos iniciales que consideraban al calcitriol como un agente inmunosupresor, que esta hormona es capaz de estimular y de suprimir la función inmune, dependiendo de las condiciones de activación y del microambiente inmunológico. La información clínica disponible y la experimentación *in vivo* e *in vitro* apoyan un efecto inmunomodulador del calcitriol; éste debe ser considerado, por lo tanto, como uno mas de la larga y creciente lista de moduladores inmunológicos con posible utilidad terapéutica.

### INTRODUCCION

En los últimos años, diferentes investigaciones han permitido reconocer un papel adicional del metabolito más activo de la vitamina D, la 1 $\alpha$ , 25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol), al interactuar con una gran variedad de tipos celulares; particularmente del sistema inmune, regulando aspectos tan importantes como la proliferación y la diferenciación celular.

El papel endocrino clásico de este seco-esteroide en la homeostasis del calcio, ha sido reconocido ampliamente(1,2). El calcitriol interactúa

específicamente con un receptor (VDR) protéico intracelular, este complejo, VDR-calcitriol, se transloca al núcleo, se homodimeriza o heterodimeriza con otros receptores nucleares y se une a elementos de respuesta a calcitriol (VDRE) en el DNA, para regular la transcripción de genes específicos y modular diferentes respuestas biológicas (3-5).

El descubrimiento hace mas de una década de estos VDRs, en líneas celulares neoplásicas (6,7), y posteriormente en monocitos, linfocitos activados, queratinocitos, células musculares, células del sistema hematopoiético, y también en páncreas, cerebro y células hipofisiarias (8), puso de manifiesto la existencia de un nuevo y desconocido papel del calcitriol en fenómenos de inmunoregulación (9).

La evidencia inicial de la interacción del calcitriol con el sistema inmune, fue consecuencia directa del estudio clínico de pacientes con sarcoidosis, un desorden granulomatoso crónico frecuentemente asociado con hipercalcemia y niveles circulantes elevados de calcitriol (10); estos niveles se atribuyeron a la síntesis ectópica por macrófagos alveolares (11). En efecto, se ha demostrado *in vitro* que macrófagos activados, tienen la capacidad de convertir la forma relativamen-

te inactiva de la vitamina D, la 25hidroxivitaminaD<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>) a la forma biológicamente mas activa, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (12). Todos estos hallazgos, sugieren que el calcitriol y sus metabolitos, pueden ser producidos por macrófagos, e igualmente, pueden modular la actividad de diversas células del sistema inmune, a través de un sistema paracrina de síntesis hormonal, que parece muy distinto del sistema clásico de actividad endocrina (9).

Este sistema paracrina de síntesis ectópica de calcitriol, en contraste con la síntesis endocrina, parece insensible a los mecanismos de retroalimentación y control por el propio calcitriol, así como por otros reguladores como el calcio y la hormona paratiroidea (13). Igualmente, está bien establecido que los macrófagos normales sintetizan calcitriol al ser activados por diversas sustancias y agentes tales como el IFN $\gamma$  (14), lipopolisacáridos (15) y otros mediadores inmunológicos. Su producción puede, por lo tanto, ser un constituyente normal y fisiológico de la respuesta inmune, al estimular la síntesis de otros mediadores inflamatorios, que a su vez afectan la actividad linfocítica, o estimulan directamente respuestas fagocíticas o citotóxicas en otros tipos celulares.

#### **Calcitriol en la regulación de la actividad de monocitos-macrófagos.**

La capacidad de los macrófagos activados de secretar calcitriol y de expresar constitutivamente el VDR, son fundamentales en la comprensión del papel inmunomodulador de este compuesto. Los macrófagos son células derivadas de precursores mieloides inmaduros que a su vez tienen un origen común en células hematopoiéticas pluripotenciales. No está aún claro en qué etapa de la maduración ocurre la inducción de la expresión del VDR (11), pero se sabe que las líneas celulares mas maduras, expresan estos receptores y responden al estímulo con calcitriol, diferenciándose hacia células monocíticas.

La actividad de 1 $\alpha$ -hidroxilasa, es decir la capacidad de producir 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, y la expresión del VDR, durante los procesos de diferenciación de monocitos hacia macrófagos maduros e histiocitos, ha sido examinada en diversos modelos experimentales. En conjunto, los resultados permiten concluir, que el proceso de diferenciación está asociado con un aumento en la capacidad de sintetizar 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, una pérdida en la actividad de síntesis de 24,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, y una disminución en la transcripción y expresión del VDR (16). Esto sugiere que los macrófagos se hacen progresivamente mas activos en términos de síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y menos sensibles a su actividad moduladora y prodiferenciadora.

En los monocitos y macrófagos presentes en sitios de inflamación tisular, el calcitriol ejerce una variedad de efectos que incluyen, el aumento en la expresión de receptores Fc, y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de TNF $\alpha$  (11), estimulando la explosión oxidativa y la función citotóxica y fagocítica de estas células. Igualmente, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> incrementa la producción de otras citoquinas y mediadores inflamatorios como la IL-1 y la prostaglandina E<sub>2</sub>, estimulando los procesos de reclutamiento inmunológico (17). Activa también, la quimiotaxis de macrófagos y favorece la multinucleación o fusión celular en caso de una respuesta inflamatoria granulomatosa (11). El calcitriol puede incrementar los procesos de presentación antigénica, al aumentar la expresión de moléculas del CMH de clase II (18).

Los mecanismos intracelulares y moleculares a través de los cuales 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y su receptor VDR ejercen estos efectos en estos tipos celulares, no están aún claramente establecidos, es probable que todo esto suceda a través de procesos de regulación transcripcional directa de los genes

involucrados, aunque también es factible la participación y concierto de otros mecanismos. La producción de IL-1 por los monocitos se encuentra mediada en parte a través de incrementos en la concentración intracelular de calcio; por ello, los reportes de incrementos rápidos en las concentraciones de calcio citoplasmático que ocurren en los monocitos como respuesta temprana a la estimulación con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (19), sugieren un mecanismo molecular potencial a través del cual 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> puede intervenir también en las respuestas biológicas de estas células.

Otro mecanismo a través del cual 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> puede modular indirectamente la actividad de los macrófagos, es por medio de la proteína transportadora sérica de vitamina D (DBP) (20). Esta proteína puede asociarse con inmunoglobulinas de membrana de linfocitos B y receptores Fc en los linfocitos T (20). Sin embargo, observaciones experimentales in vitro con DBPs murinas y bovinas, sugieren que el mecanismo de regulación es indirecto ya que la DBP es un precursor del factor activador de macrófagos (21,22). Igualmente, esta proteína puede incrementar significativamente la actividad quimiotáctica de diversos péptidos como C5a (23).

**Calcitriol en la regulación de la actividad de linfocitos T.** A diferencia de los monocitos y macrófagos que expresan el VDR constitutivamente, las células T requieren de su activación para la expresión (9). Las mayores subpoblaciones de células T activadas, CD4 y CD8, presentan concentraciones similares del VDR (24); esta expresión está regulada finamente en diferentes etapas de maduración y en respuesta a diversas señales activadoras externas (25).

La principal acción de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en las células T, corresponde a la inhibición de la proliferación y de la secreción de citoquinas, sin importar la se-

ñal activadora (26). Al parecer, el calcitriol media sus efectos antiproliferativos después de la activación linfocítica inicial. El calcitriol no afecta la transcripción y síntesis de RNA necesaria para el paso en el ciclo celular del estadio G0 a G1; por el contrario, sí inhibe la síntesis de RNA necesaria para que la célula progrese de G1 temprano a G1 tardío, sin permitir que el linfocito se haga competente para los procesos de síntesis y duplicación del DNA (9,27).

Por el contrario, la expresión del VDR y quizás la habilidad de esta proteína para interactuar con el DNA en los linfocitos varía dependiendo de la vía particular de activación y de la magnitud de ésta. Las señales de activación que controlan la expresión del VDR en linfocitos humanos, han sido examinadas ampliamente; los resultados, concluyen que la expresión del VDR en linfocitos es estimulada y regulada por señales diferentes y contingentes, probablemente a nivel transcripcional o post-transcripcional, provenientes del TCR, de la vía dependiente de la proteína quinasa C y quizás de otros mediadores intracelulares (25,28). La expresión del VDR, requiere una completa competencia de estos procesos de activación linfocítica (25) ya que al parecer, el gen del VDR se encuentra reprimido en los linfocitos no activados y las señales activadoras inducen su desrepresión (28).

El efecto supresor del calcitriol, parece mediado a través de la inhibición de la síntesis y secreción de IL-2 (11,26,29); sin embargo, el calcitriol puede ejercer su efecto antiproliferativo a través de mecanismos independientes de IL-2, probablemente al disminuir la secreción de otras citoquinas mitogénicas tales como IL-4 e IFN $\gamma$  (9) o al inhibir la expresión del oncogen c-myc (30). Diversos hallazgos, sugieren que el mecanismo inhibitorio dependiente de IL-2 es debido a la capacidad del VDR de unirse a las regiones

promotoras del gen de IL-2 inhibiendo la actividad transcripcional (9). Estas secuencias unen diversos factores transcripcionales, AP-1, NF $\kappa$ B, Oct-1, y NFATp, inducidos por la estimulación del linfocito T (10,31). Los resultados indican, igualmente, que la unión del VDR al DNA es necesaria pero no suficiente para mediar la represión del gen de IL-2, por ello, combinando proteínas purificadas in vitro, se observó la inhibición de la unión de los factores transcripcionales NFATp/AP-1 al DNA por la adición de VDR o heterodímeros VDR-RXR (RXR, receptor del ácido 9-cis retinóico), es decir la inhibición directa de activadores transcripcionales del gen de IL-2 (19).

Por otra parte, los mecanismos de activación linfocítica, requieren elevaciones e incrementos en la concentración intracelular de calcio; por ello, los reportes de incrementos rápidos en las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a la estimulación con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , permiten suponer una vía adicional a través de la cual  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  puede regular la actividad linfocítica (9,19).

El calcitriol también inhibe la síntesis de IFN $\gamma$  por las células T (32), limitando los procesos de activación de los macrófagos, disminuyendo la secreción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y por lo tanto, ejerciendo un mecanismo de autorregulación y retroalimentación negativa (11); también incrementa la producción de IL-1 por los monocitos y los macrófagos induciendo la activación linfocítica (33). Sin embargo, una vez que las células se activan y expresan el VDR, están sujetas a los procesos de inhibición mediados por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

**Calcitriol en la regulación de la actividad de linfocitos B.** Los linfocitos B inducen y expresan el VDR después de los procesos normales de activación o por la transformación con el virus Epstein-Barr (9). El calcitriol, inhibe

indirectamente la producción de inmunoglobulinas por las células B (34), debido, al parecer, a una supresión de la actividad estimuladora de los linfocitos T cooperadores (9,11). Sin embargo, es probable que el calcitriol tenga también un efecto inhibitorio más directo; aunque no está claro en qué medida este efecto pueda ser dependiente únicamente de la interacción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  con el VDR en las células B (34). Estudios recientes, sugieren que, a pesar de que los linfocitos B pueden expresar el VDR, estas células parecen presentar un bloqueo funcional de las vías de regulación transcripcional mediadas por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su receptor (35).

Se ha reportado que la proliferación de células B humanas purificadas y estimuladas in vitro con lectinas puede ser tanto sensible como insensible a la acción inhibitoria del calcitriol (9). Varios hallazgos experimentales sugieren que existe una inhibición directa de la secreción de anticuerpos (particularmente IgG e IgM) en estas células (9,36). Todo esto indica que de existir un proceso de inhibición directa través del VDR, es únicamente a nivel de la secreción de inmunoglobulinas y no a nivel de la proliferación o diferenciación; sin embargo, es probable que el calcitriol, al modular la actividad de LT cooperadores, pueda estar regulando por igual (directa e indirectamente) todos los mecanismos de la activación plasmocítica. El calcitriol puede ser, por lo tanto, considerado como uno más de la larga y creciente lista de mediadores inmunológicamente importantes, a través del cual las diversas poblaciones celulares se comunican entre sí, regulando además de los procesos inmunológicos otros aspectos de la fisiología normal o patológica.

**Aspectos clínicos de la inmunomodulación por calcitriol en los procesos inflamatorios.** Los procesos inflamatorios sistémicos o localizados, están acompañados de la producción

de diversas citoquinas y mediadores inflamatorios por diferentes tipos celulares; estas citoquinas, y particularmente el IFN $\gamma$ , permiten la inducción enzimática y la producción localizada de calcitriol por los macrófagos. Como consecuencia de su acción autocrina, se estimula la actividad fagocítica, citotóxica, presentadora de antígenos y secretora (IL-1) de estas células, promoviendo una respuesta inmune inicial. Esta incluye también el reclutamiento de monocitos adicionales al promover la diferenciación de células madre precursoras (8,9). Sin embargo, estos efectos estimuladores son contrarrestados por la capacidad del calcitriol de inhibir directamente a través de su receptor, la proliferación de los linfocitos T cooperadores activados (11), y suprimir directa o indirectamente la activación, la proliferación y la secreción de inmunoglobulinas de las células B (9,36). Esto representaría un mecanismo de retroalimentación y control de la respuesta inmune en estos microambientes inflamatorios.

**Aspectos clínicos de la inmunomodulación por calcitriol durante la resorción ósea.** La síntesis paracrina de 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  puede modificar sus efectos en la homeostasis mineral a través de su actividad inmunomoduladora. Junto con sus efectos inmunológicos, muchos de los mediadores y citoquinas, estimulan la resorción ósea, e inhiben la formación ósea (37-39). La producción localizada de IL-1, TNF $\alpha$  y PGE $_2$  por parte de los monocitos activados con calcitriol puede inducir la resorción ósea (39,40). En contraste, el calcitriol bloquea también la producción de IFN $\gamma$  lo que puede inhibir a su vez la movilización de los depósitos óseos de calcio. El efecto final de la actividad inmunomoduladora del calcitriol en el esqueleto óseo y metabolismo mineral, parece favorecer la movilización de calcio y la resorción ósea (41).

La osteocalcina, es la proteína no-

colágena mas abundante en el hueso, es un producto específicamente osteoblástico, y su producción se correlaciona de cerca con la formación de hueso y el control de la resorción ósea. La IL-6 y TNF $\alpha$ , al parecer, inhiben la región promotora del gen de osteocalcina; sin embargo, la IL-1, IL-2, IL-3, IL-7 y otros factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias, no parecen ejercer un efecto regulador sobre el gen de osteocalcina (42). Estas observaciones, permiten evidenciar la compleja red de interacciones entre los diversos mediadores inflamatorios y 1,25(OH) $_2$ D $_3$ .

**Aspectos clínicos de la inmunomodulación por calcitriol en enfermedades renales.** Los estados clínicos asociados a deficiencias de vitamina D se encuentran asociados más a una inmunidad defectuosa que a una incrementada; y la inmunidad celular se encuentra alterada en enfermedades renales en las cuales la producción del calcitriol por el riñón ha cesado. La administración de un análogo de calcitriol, la 1 $\alpha$ -hidroxivitamina D $_3$  a pacientes hemodializados con falla renal, conduce a la normalización de la respuesta linfoproliferativa alterada por la enfermedad de base. Igualmente, la administración de 1 $\alpha$ -hidroxivitamina D $_3$  a ratas con osteodistrofia renal, incrementa la respuesta linfosecretora primaria (43,44).

**Aspectos clínicos de la inmunomodulación por calcitriol en enfermedades infecciosas.** En la tuberculosis existe una relación entre las deficiencias de 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  y las alteraciones en los mecanismos de resistencia al Mycobacterium; las sugerencias que 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  pudiese ser benéfica en el tratamiento de la tuberculosis a largo plazo, están ahora apoyadas por estudios epidemiológicos y clínicos indicando una estrecha relación entre incidencia de la enfermedad y deficiencia del calcitriol, lo que puede suponer un efecto antituberculoso de la calcitriol

como ha sido descrito recientemente in vitro (45). Adicionalmente, la administración de la hidroxivitamina D $_3$  a individuos ancianos normales, incrementó la reacción tuberculínica y causó una elevación significativa de los niveles circulantes de IFN $\gamma$  (46). Estos hallazgos clínicos permiten evidenciar de manera clara, la capacidad inmunoestimulante del calcitriol. Estudios más recientes, han demostrado también que el 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  puede inhibir también la expresión de moléculas de CD4 y por lo tanto, la infección de los monocitos humanos por el virus de la inmunodeficiencia humana (47).

**Aspectos clínicos de la inmunomodulación por calcitriol en enfermedades granulomatosas.** La importancia clínica de la producción local de calcitriol por células del sistema inmune, se pone de manifiesto en la sarcoidosis, una enfermedad granulomatosa, en la que los macrófagos alveolares y los histiocitos de los nódulos sarcoideos producen 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  excediendo las concentraciones habituales de calcitriol en suero y produciendo sintomatología asociada a hipercalcemia persistente, inclusive a pesar de la supresión de la síntesis endocrina o renal de calcitriol (12,48).

**Aplicaciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes.** Recientemente se han desarrollado una variedad de análogos sintéticos de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$  con igual o superior potencia sobre células del sistema inmune y con menores propiedades hipercalcémicas que el calcitriol. Los estudios acerca de la efectividad de tales compuestos se han llevado a cabo en modelos animales de autoinmunidad. Uno de estos modelos, y el más extensamente estudiado corresponde a la línea de ratones MRL/1; éstos desarrollan una enfermedad muy similar al lupus eritematoso sistémico humano, manifestando poliarteritis, poliartritis, linfocitocis y autoanticuerpos séricos (49). En estos ratones se han utilizado diversos análogos; uno de ellos, deno-

minado 1,24-R-D<sub>3</sub>, evitó la proteinuria y recuperó los niveles de subpoblaciones linfocíticas específicas (50). Igualmente, se demostró que la administración oral del análogo 22-oxa-D<sub>3</sub>, corrigió la linfadenopatía generalizada y la proteinuria característica (25). Este último compuesto prolongó de manera sorprendente el tiempo de sobrevida de estos ratones autoinmunes (51).

**Aplicaciones terapéuticas en enfermedades proliferativas.** En pacientes con psoriasis, se ha observado una adecuada respuesta a la aplicación ectópica de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o de análogos como el calcipotriol. Sin embargo, en algu-

nos estudios su utilización se vió limitada por el efecto hipercalcémico y en otros, no hubo modificación de los parámetros de metabolismo de calcio; se sugiere, por lo tanto, que este compuesto a concentraciones adecuadas puede utilizarse en el tratamiento de la psoriasis. Sin embargo, se sabe que se requiere de manera continua. Otro análogo el 1,24(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> puede utilizarse para el tratamiento por periodos cortos en estos pacientes (52).

Por otra parte, el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas con calcitriol ha sido decepcionante, aunque algunas buenas respuestas se observaron, hace algún tiempo, en pa-

cientes con linfomas de bajo grado de malignidad (53).

A pesar de algunos resultados adversos, el desarrollo de análogos, que modulen específicamente las actividades proliferativas o diferenciadoras, sin incrementar de manera significativa la movilización de calcio, puede generar nuevas posibilidades y aumentar la eficacia clínica en el tratamiento de diversas enfermedades. Se necesita, sin embargo, que el desarrollo clínico esté acompañado de un entendimiento mejor de la unión del análogo al VDR, de los mecanismos de acción y del metabolismo de éste en el organismo. Las posibilidades de aplicación son amplias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brommage R, Deluca HF.** Evidence that 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is the physiologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinol Rev* 1985; 491-511.
2. **Christakos S, Raval-Pandya M, Wernij RP, Yang W.** Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochem J* 1996; 316: 361-371.
3. **Ozono K, Sone T, Pike JW.** The genomic mechanisms of action of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Bone Min Res* 1991; 6: 1021-1027.
4. **Kahlen JP, Carlberg C.** Allosteric interaction of the 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and the retinoid X receptor on DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4307-4313.
5. **Lemon B, Freedman L.** Selective effects of ligands on vitamin D<sub>3</sub> receptor and retinoid X receptor mediated gene activation in vivo. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1006-1016.
6. **De luca HF, Ostrem V.** The relationship between vitamin D system and cancer. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206: 413-429.
7. **Eisman JA.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and role of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in human cancer cells. *Vitamin D* 1984; 1-10.
8. **Lemire JM.** Immunomodulatory role of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Cell Biochem* 1992; 49: 26-31.
9. **Rigby WF.** The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* 1988; 9: 54-58.
10. **Papapoulos SE, Clemens TL, Fraher LJ, Lewin IG, Sandler LM, O'Riordan JL.** 1,25-Dihydroxycholecalciferol in the pathogenesis of hypercalcemia of sarcoidosis. *Lancet* 1979; 1: 627-630. Referido en: Hewison M. Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol* 1992; 132: 173-175.
11. **Hewison M.** Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol* 1992; 132: 173-175.
12. **Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR.** Metabolism of 25-hydroxy D<sub>3</sub> by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest* 1983; 72: 1856-1860.
13. **Reichel H, Koeffler HP, Norman AW.** Molecular and cellular regulation of calcium and phosphate metabolism. *Prog Clin Biol Res* 1990; 332: 81-97.
14. **Koeffler HP, Reichel H, Bishop JE, Norman AW.** g-interferon stimulates production of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by normal macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1985; 127: 596-603.
15. **Reichel H, Koeffler HP, Bishop JE, Norman AW.** 25-Hydroxy D<sub>3</sub> metabolism by lipopolysaccharide-stimulated normal human macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1-9.
16. **Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993; 82,4: 1300-1307.
17. **Polla BS, Healy AM, Amento EP, Krane SM.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> maintains adherence of human monocytes and protects them from thermal injury. *J Clin Invest* 1986; 77: 1332-1339.
18. **Morel PA, Manolagas SC, Provvedini DM, Wegmann DR, Chiller JM.** Interferon g-induced IA expression in WEHI-3 cells is enhanced by the presence of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Immunol* 1986; 136: 2181-2186.
19. **Baran DT, Imilne ML.** *J Clin Invest.* 1986; 77: 1622-1626. Referido en: Rigby W. The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* 1988; 9: 54-58.
20. **Ades EW, Bosse D, Nicholson JK, Galbraith R.** Interaction of Gc with membrane of activated natural cytolytic cells. *Tokai J Exp Clin Med* 1988; 13: 293-297.
21. **Nobuto Y.** Vitamin D<sub>3</sub> binding protein as a precursor for macrophage activating factor in the inflammation primed

- macrophage activation cascade in rats. *Cell Immunol* 1996; 170: 161-167.
22. **Nobuto Y.** Role of DBP in activation of mouse macrophages. *J Immunol* 1996; 157: 1744-1749.
23. **Kew RR, Fisher JA, Webster RO.** Co-chemotactic effect of Gc globulin for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J Immunol* 1995; 155: 5369-5374.
24. **Provvedini DM.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor distribution and effects in subpopulations of normal human T lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 124: 1532-1538.
25. **Manolagas S, Hustmyer FG, Yu XP.** Immunomodulating properties of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Kidney Int* 1990; 38-29: 9-16.
26. **Rigby WF, Stacy T, Fanger MW.** Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Invest.* 1984; 74: 1451-1455.
27. **Rigby WF, Noelle RJ, Krause K, Fanger MW.** The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human T lymphocyte activation and proliferation, a cell cycle analysis. *J Immunol* 1985; 135: 2279-2286.
28. **Xiao P.** Vitamin D receptor expression in human lymphocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 7588-7595.
29. **Muller K, Odum N, Bendtzen K.** 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> selectively reduces IL-2 levels and proliferation of human T cell lines in vitro. *Immunol Lett* 1993; 35: 177-182.
30. **Karmall R.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T lymphocytes. *Immunol* 1991; 74: 589-593.
31. **Alroy I, Towres T, Freedman L.** Transcriptional repression of the IL-2 gene by vitamin D<sub>3</sub>. Direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5789-5799.
32. **Rigby WF, Denome S, Fanger MW.** Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte action by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest* 1987; 79: 1659-1664.
33. **Bhalla AK, Amento EP, Krane SM.** Differential effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human lymphocytes and monocytes/macrophages: Inhibition of IL-2 and augmentation of IL-1 production. *Cell Immunol* 1986; 98: 311-322.
34. **Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC.** 1a25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1984; 74: 657-661.
35. **Morgan JW, Reddy GS, Uskokovic MR, May BK, Omdahl JL, Maizel AL, et al.** Functional block for 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-mediated gene regulation in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1994; 269,18: 13437-13443.
36. **Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> binding macromolecules in human B lymphocytes: Effects on immunoglobulin production. *J Immunol* 1986; 136: 2734-2740.
37. **Dinarelli CA.** IL-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 1989; 44:153-205.
38. **Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR.** Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 1986; 319: 516-518.
39. **Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley J.** IL-1 is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Min Res* 1987; 2: 559-565.
40. **Canalis E.** Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro. *Endocrinology* 1987; 121: 1596-1604.
41. **Kawano M, Yamamoto I, Iwato K, Tanaka H, Aosuka H.** IL-1 rather than lymphotoxin is the major bone resorbing activity in human multiple myeloma. *Blood* 1989;73:1646-1649.
42. **Li YP, Stashenko P.** Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor α and IL-6, but not IL-1, down regulate the osteocalcin gene promoter. *J Immunol* 1992; 148: 788-794.
43. **Ohsugi Y.** Effect of 1a Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the immune response. *Vitamin D: A chemical, biochemical and clinical update.* 1985; 209-218.
44. **Okano K.** Effect of active vitamin D<sub>3</sub> on human immune function in vivo. *Vitamin D: A chemical, biochemical and clinical update* 1985;717-722.
45. **Rook GA, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O'Riordan J, Stanford J.** Vitamin D<sub>3</sub>, g-interferon and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunol* 1986; 57: 159-163.
46. **Chihara K.** Radioimmunoassay of plasma interferon in osteoporosis. *Classif Tissue Int* 1985; 42: 42-43.
47. **Connor R.** *Biochem Biophys Res Comm* 1991;176: 852-859. Referido en: Hewison M. Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol* 1992; 132: 173-175.
48. **Galen L.** Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: Evidence of extrarenal generation of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *N Eng J Med* 1981; 305: 440-443.
49. **Lemire JM, Ince A, Takashima M.** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992; 12: 143-148
50. **Koizumi T, Nakao Y, Matsui T, Nakagawa T, Matsuda S, Komoriya K, et al.** Effects of corticosteroid and 1,24R-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> administration on lymphoproliferation and autoimmune disease in MRL/MP-1pr/1pr mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 396-404.
51. **Abe J, Takita Y, Nakano T, Miyaura C, Suda T, Nishii Y.** A synthetic analogue of vitamin D<sub>3</sub>, 22-oxa-1a,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is potent modulator of in vivo immunoregulation activity without inducing hypercalcemia in mice. *Endocrinology* 1989; 124: 2645-2647.
52. **Bouillon R, Garmyn M, Verstuyf A, Segaeert S, Casteels K, Mathieu C.** Paracrine role for calcitriol in the immune system and skin creates new therapeutic possibilities for vitamin D analogs. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 7-16.
53. **Cunningham D.** *Brit Med J* 1985; 291: 1153-1155. Referido en: Rigby W. The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* 1988; 9: 54-58.