



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DE LA VITAMINA D TRAS
EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS**

María Isabel Montero Cuadrado

Sevilla 2015

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

D. José Antonio Pérez-Simón, Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA VITAMINA D TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS” realizado por la licenciada M^a Isabel Montero Cuadrado bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, a 29 de Septiembre de 2015.

Fdo. Dr. José Antonio Pérez Simón

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

D. Ildelfonso Espigado Tocino, Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA VITAMINA D TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS” realizado por la licenciada M^a Isabel Montero Cuadrado bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, a 29 de Septiembre de 2015.

Fdo. Dr. Ildelfonso Espigado Tocino

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Dña. Teresa Caballero Velázquez, Doctora en Medicina por la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA VITAMINA D TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS” realizado por la licenciada M^aIsabel Montero Cuadrado bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, a 29 de Septiembre de 2015.

Fdo. Dra. Teresa Caballero Velázquez

Agradecimientos

A Jose Antonio Pérez Simón, por la idea y el diseño del ensayo en que se basa esta tesis, por su apasionado compromiso con la investigación y por confiar en mí.

A Ildelfonso Espigado, por ayudarme a superar los obstáculos, por aportarme su experiencia en la dirección de trabajos científicos y por los muchos años de trabajo juntos.

A Teresa Caballero, por el trabajo biológico de la tesis y por sustentar todo el proyecto, por su rigor y generosidad, por ofrecerme su amistad y sus extensos conocimientos.

Al Dr. José Villar, tutor del programa de doctorado, por facilitarme los trámites de este proyecto y por su orientación.

A Paco Márquez, por el análisis estadístico, por su talento y buena disposición para resolver las continuas dudas que le planteamos.

A Paola y a Ana, por su ayuda con el trabajo técnico y su siempre amable colaboración.

A los investigadores de todos los centros que han participado en el ensayo de esta tesis, por hacerla posible con su cooperación.

A mis compañeros de la primera planta sur del hospital general Virgen del Rocío, por los buenos y malos momentos compartidos.

A mis compañeros de la quinta planta del edificio de laboratorios del hospital Virgen del Rocío, por ayudarnos con los enfermos en el día a día.

Al personal del Instituto de Biomedicina de Sevilla que trabaja con los hematólogos, en especial, a Ignacio Sánchez Abarca, por ser nuestro nexo con la investigación básica.

A mis pacientes, en especial, a los que ya no están, y a sus familias, por todo lo que me enseñaron.

A mis padres, mis referentes, por educarnos entre libros y en lo verdaderamente importante.

A mis dos hermanas y a mi hermano, por los recuerdos de nuestra infancia, por la fortuna de seguir creciendo juntos

A Jesús, mi marido, y a Inés y Manuel, nuestros queridos hijos, por hacerme una persona feliz.

Abreviaturas

ARNm: ARN mensajero

ATG: globulina antitimocítica (*en inglés, "antithymocytic globulin"*)

BAAF: factor activador de células B (*en inglés, "B-cell activating factor"*)

CAMP: catelicidina (*en inglés, "cathelicidin antimicrobial peptide"*)

CDs: células dendríticas.

CD: cluster de diferenciación.

Células NK: células asesinas naturales (*en inglés, "natural killer"*).

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CNI: inhibidores de calcineurina (*en inglés, "calcineurine inhibitors"*)

CPA: células presentadora de antígeno.

CsA: ciclosporina

CYP24A1: enzima del citocromo p450 24A1, también conocida como 1,25-dihidroxi vitamina D3 hidroxilasa

CYP27B1: enzima del citocromo p450 27B1, también conocida como 25-hidrovitamina D3 1- α - hidroxilasa

DAG: diacilglicerol

DEFB4: beta defensina (*en inglés, "defensine, beta 4"*)

DBP: proteína de unión a albúmina (*en inglés, "D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein"*)

EICH: enfermedad injerto contra huésped.

EICHa: EICH aguda

EICHc: EICH crónica

EVOH: enfermedad venooclusiva hepática

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (*en inglés, "fibroblastic growth factor"*)

FK506: tacrolimus

GVHD: enfermedad injerto contra huésped (*en inglés, "graft versus host disease"*).

HAMP: hepcidina (*en inglés, "hepcidine antimicrobial peptide"*)

HLA: antígeno leucocitario humano (*en inglés, "human leucocyte antigen"*)

IFN: interferón

IL: interleucina.

IP3: inositol 1,4,5-trifosfato

ITAM: módulo de activación del inmunoreceptor rico en tirosina (en inglés, "*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*")

JNK: quinasa c-Jun N-terminal (en inglés, "*Jun N Kinase*")

KIR: receptores inmunoglobulínicos de las células NK (del inglés, "*killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptors*")

LMA: leucemia aguda mieloblástica

LPS: lipopolisacáridos

MiHAs: antígenos menores de histocompatibilidad.

MTX: metotrexate

NF- κ B: factor nuclear κ B (en inglés, "*nuclear factor κ B*")

NFAT: factor nuclear de células T activadas (en inglés, "*nuclear factor of T activated cells*")

PAMP: patrones moleculares asociados a vigilancia de patógenos (en inglés "*pathogen associated molecular patterns*")

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa (en inglés, "*phosphatidil inositol 3 kinase*")

PLC: fosfolipasa C (en inglés, "*phospholipase C*")

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (en inglés, "*pattern recognition receptor*")

RAR: receptor del ácido retinoico (en inglés, "*retinoid acid receptor*")

RXR: receptor X de los retinoides (en inglés, "*retinoid X receptor*")

SMD: síndromes mielodisplásicos

SP: sangre periférica

TAP: transportador asociado con el procesamiento del antígeno (en inglés, "*transporter associated with antigen procesing*")

TCR: receptor de célula T (en inglés, "*T cell receptor*")

TGF β : factor de crecimiento transformante (en inglés "*transforming growth factor β* ")

TNF: factor de necrosis tumoral (en inglés, "*tumor necrosis factor*")

TNFr: receptor de TNF

Th1: T helper tipo 1

Th2: T helper tipo 2

Th17: T helper tipo 17

TLR: en inglés, *Toll like receptor*.

TNF: factor de necrosis tumoral (*en inglés, "tumoral necrosis factor"*)

TPH: trasplante de progenitores hematopoyético.

VDR: receptor de la vitamina D (*en inglés, "vitamin D receptor"*)

25(OH) D3: 25-hidroxi- vitamina D

1,25(OH)₂D3: 1,25-di-hidroxi-vitaminaD

Índice

1. Enfermedad injerto contra huésped

1.1. Inmunobiología de la EICH

1.1.1. Activación de las células presentadoras de antígenos

1.1.2. Activación de células T, diferenciación y migración

1.1.3. Fase efectora de la EICH

1.2. Fisiopatología de la EICH crónica

1.2.1. EICH crónica y compatibilidad HLA

1.2.2. EICH crónica y células presentadoras de antígenos

1.2.3. EICH crónica y células T

1.2.4. EICH crónica y linfocitos B

1.3. Clínica de la EICH

1.3.1. EICH aguda

1.3.2. EICH crónica

1.4. Profilaxis y tratamiento de la EICH

1.4.1. Profilaxis

1.4.2. Tratamiento.

2. Vitamina D y sistema inmune

2.1. Vitamina D e inmunidad innata

2.1.1. Macrófagos, vitamina D y catelicina

2.1.2. Células dendríticas y presentación antigénica

2.2. Vitamina D e inmunidad adaptativa

2.2.1. Vitamina D y linfocitos T

2.2.2. Vitamina D y linfocitos B

2.3. Huella genética de la vitamina D en el sistema inmune

2.4. Estatus de la vitamina D y la función inmune

2.5. Vitamina D y la patología humana

2.5.1. Vitamina D e infección

2.5.2. Vitamina D y enfermedades inmunes

2.5.2.1. Vitamina D y esclerosis múltiple

2.5.2.2. Vitamina D y diabetes tipo 1

2.5.2.3. *Vitamina D y enfermedad de Chron*

2.5.3. *Vitamina D y hemopatías malignas*

2.5.3.1. *Vitamina D como terapia de diferenciación en patología mieloide*

2.5.3.2. *Vitamina D en hemopatías malignas no mieloides*

2.5.3.3. *Vitamina D como moduladora de la respuesta inmune en trasplante alogénico*

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Pacientes*

1.1. *Selección de pacientes*

1.1.1. *Criterios de inclusión*

1.1.2. *Criterios de exclusión.*

1.2. *Diseño del estudio.*

1.2.1. *Seguridad*

1.3. *Muestras biológicas.*

2. *Método.*

2.1. *Estudio de inmunofenotipo celular.*

2.1.1. *Materiales*

2.1.2. *Estudio de proteínas de membrana.*

2.1.2.1. *Análisis inmunofenotípico de CDs*

2.1.2.2. *Estudio de otras poblaciones celulares.*

2.1.2.2.1. *Análisis inmunofenotípico de linfocitos T vírgenes/memoria central/efector/memoria periférico*

- 2.1.2.2.2. *Análisis de células NK*
- 2.1.2.2.3. *Estudio de linfocitos T reguladores*
- 2.1.3. *Activación de linfocitos.*
- 2.2. *Estudio de citocinas celulares.*
- 2.3. *Estudio de niveles de 25 OH vit D3*
- 2.4. *Análisis estadístico.*

RESULTADOS

- 1. *Perfil de seguridad*
- 2. *Enfermedad injerto contra huésped*
 - 2.1. *EICH aguda*
 - 2.2. *EICH crónica*
- 3. *Recaída, mortalidad no relacionada con la recaída y supervivencia global*
- 4. *Infección por CMV*
- 5. *Estudios de inmunofenotipo*
 - 5.1. *Células dendríticas*
 - 5.2. *Distribución de subpoblaciones linfocitarias*
 - 5.2.1. *Linfocitos B*
 - 5.2.2. *Linfocitos T "naive"/memoria/efector*
 - 5.2.3. *Linfocitos T reguladores*
 - 5.2.4. *Células NK*
- 6. *Activación linfocitaria*
- 7. *Citocinas en suero*
- 8. *Niveles de vitamina D*

9. Análisis según la presencia de EICH aguda

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

1. Introducción

2. Discusión

Introducción

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas. Sin embargo, su principal complicación, la enfermedad injerto contra huésped (EICH), limita su eficacia, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad tras el trasplante.

1.1. Inmunobiología de la EICH.

De acuerdo al modelo propuesto por Ferrara⁽¹⁾, el desarrollo de la EICH pueden ser divididos en tres etapas secuenciales: activación de las células presentadoras de antígenos (CPAs), activación de las células T del donante, diferenciación y migración y por último la activación de la fase efectora⁽²⁾(figura 1).

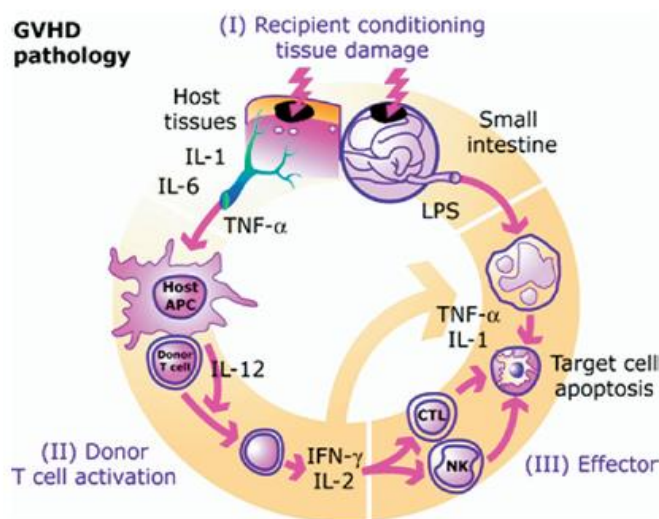


Figura 1. Las tres fases de la inmunobiología de la EICH.¹

1.1. 1. Activación de las células presentadoras de antígenos.

La fase temprana de la EICH se pone en marcha por el profundo daño causado en los tejidos sanos del receptor por el tratamiento de acondicionamiento, a lo que se suman los tratamientos previos, la enfermedad subyacente y los procesos infecciosos intercurrentes. Los tejidos dañados

¹ Tomado de la siguiente publicación: Sun Y, Tawara I, Toubai T, et al. Pathophysiology of acute graft versus host: recent advances. Translational Research 2007 150(4): 197-214

responden con múltiples cambios, incluyendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IFN α e IL-1. Estas "señales de peligro" activan a las CPAs del receptor, que incrementan la expresión de moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La lesión del tracto gastrointestinal debido al tratamiento de acondicionamiento es particularmente importante durante este proceso porque favorece la translocación sistémica de productos microbianos inmunoestimuladores tales como el lipopolisacárido (LPS), con la consiguiente activación de las CPAs. En este caso, el tejido linfoide del tracto gastrointestinal es el lugar en el que se produce la interacción inicial entre las CPAs y los linfocitos T del donante^(3,4). Las CPAs del huésped son por tanto críticas en esta fase.

1.1.2. Activación de células T, diferenciación y migración.

La interacción entre células T del donante y CPAs del receptor conduce a la activación de las primeras. El receptor de célula T (TCR del inglés "*T cell receptor*") del linfocito donante puede reconocer aloantígenos mediante presentación directa (CPAs del huésped) o indirecta (CPAs del donante, en fases más tardías)(figura 2). Para el desarrollo de la EICH se requiere que las células inmunocompetentes del injerto reconozcan proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad no expresadas en el donante, siendo también importantes las discrepancias a nivel de antígenos menores de histocompatibilidad (mHA) en caso de sujetos HLA idénticos. Los mHA se definen como aloantígenos capaces de generar una respuesta linfocitaria T entre sujetos HLA idénticos y son péptidos derivados de proteínas intracitoplasmáticas polimórficas que pueden presentarse en la membrana celular asociados a moléculas HLA de clase I o II ⁽⁵⁾. La presentación de estas proteínas se lleva a cabo tras un procesamiento en el que intervienen complejos enzimáticos a nivel citoplasmático (proteosomas, animopeptidasas) que dan lugar a péptidos de 8-10 aminoácidos. Estos son posteriormente transferidos al retículo endoplásmico mediante el transportador TAP ("*transporter associated with antigen procesing*") donde, tras un proceso de maduración en el que intervienen enzimas como la tapasina, calnexina y calreticulina, entre otras, se unen a moléculas HLA de clase I en el caso de

proteínas endógenas o a moléculas HLA de clase II en el caso de proteínas exógenas. Una vez que el antígeno ha sido procesado y presentado por la célula dendrítica, la interacción del complejo HLA-antígeno con el receptor TCR-CD3 conduce a la activación de señales intracitoplasmáticas que finalmente provocan la activación linfocitaria. Por tanto, una vez que el linfocito T interactúa con la CD se activan una serie de tirosina-kinasas que conducen a la fosforilación de ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) en la región intracitoplasmática del receptor TCR. Esto favorece el reclutamiento de ZAP-70 que a través de la Fosfolipasa C (PLC) genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) aumentando los niveles de Protein Kinasa-C y calcio (Ca^{2+}) en el citosol. El Ca^{2+} activa la fosfatasa Calcineurina lo que produce el paso al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B, NFAT o JNK, induciendo la activación y proliferación linfocitaria. La presentación de antígenos de distintos órganos dianas por las CPAs del huésped y del donante puede tener un papel diferencial en el daño orgánico⁽⁶⁻⁸⁾. Se requiere además de la interacción anteriormente mencionada la participación de moléculas coestimuladoras para la generación de una segunda señal que haga posible la proliferación y diferenciación de los linfocitos T⁽⁹⁻¹²⁾. Existen dos grupos fundamentales de moléculas coestimuladoras, que pertenecen a la familia B7 y la del receptor TNF. Su papel en la EICH es muy importante de modo que el bloqueo de señales coestimuladoras positivas (CD28, ICOS, CD40, CD 30, 4-1BB y ex 40) reduce la EICH en modelos murinos mientras que el antagonismo de señales inhibitorias (PDI y CTLA-4) exacerba la EICH. Los factores de transcripción anteriormente mencionados también son activados a través de las rutas de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)- Akt y MAP-kinasas, que dependen de la estimulación del linfocito a través de las señales co-estimuladoras. Finalmente, estas moléculas coestimuladoras también actuarían a través de CARMA-1, una proteína de membrana con actividad guanilato quinasa, que favorece el ensamblaje o acumulación de múltiples receptores en un “inmunosoma”^(13,14) (figura 2).

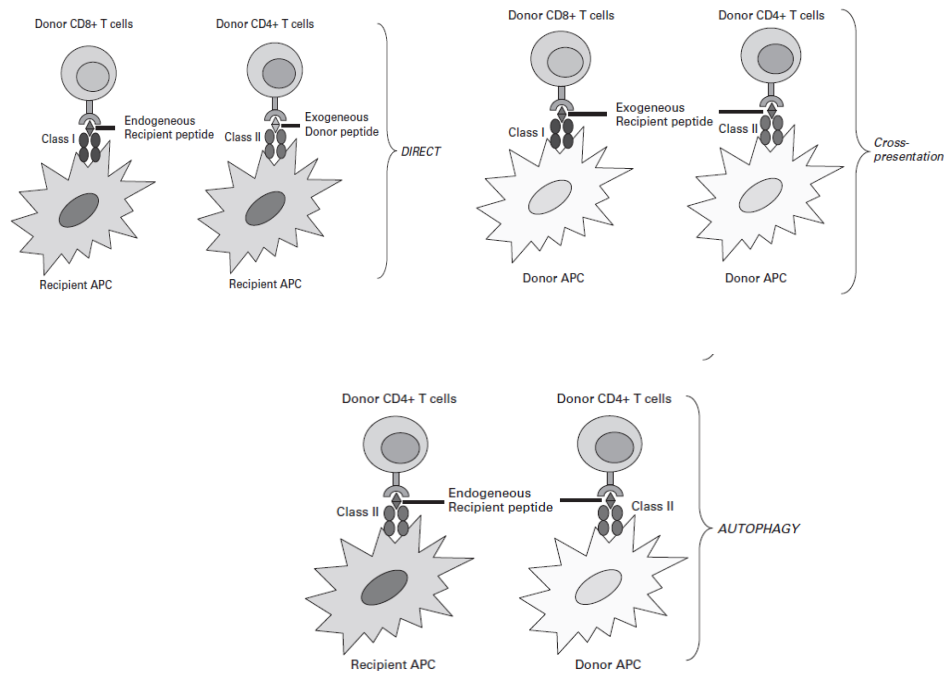


Figura 2. Vías de presentación de antígenos en la EICH. Los antígenos endógenos liberados por autofagia pueden ser presentados por las células T CD4 a través de las moléculas HLA clase II²

En cuanto a los subtipos celulares T que participan en este proceso, existen dos subpoblaciones bien diferenciadas por las proteínas CD8 y CD4, que son correceptoras para la porción constante de las moléculas HLA clase I y clase II respectivamente. Ambas subpoblaciones son fundamentales en la producción de la EICH.

Las células T vírgenes definidas por un fenotipo CD45RA^{pos} CD45RO^{neg} CCR7^{pos} CD62L^{pos} pueden causar EICH⁽¹⁵⁻²¹⁾. En diversas publicaciones se muestra como la expresión del marcador CD62L es crítica para la regulación de la EICH por las células T reguladoras del donante. Por el contrario, la capacidad de los linfocitos T de memoria para provocar EICH es menor, a pesar de su capacidad para producir rechazo tras trasplante de órgano sólido. En el mismo sentido la expresión de receptor de la quimiocina CC7 (CCR7 del inglés “CC-chemokine receptor 7”) presente en las células "naive" es fundamental para su desplazamiento a los nódulos linfáticos. Modelos animales con ratones deficientes para este receptor (CCR7^{-/-}) muestran un desarrollo de

² Tomado de la siguiente publicación: Paczesny S, Hanauer D, Sunz Y, et al. New perspectives on the biology of acute graft versus host. Bone Marrow Transplantation 2010 45: 1-11.

EICH atenuado mientras que mantienen el efecto injerto contra leucemia. Así mismo, linfocitos T CD45RA- específicos frente a CD19 (CAR+CD45RA-) mantienen su actividad antileucémica mientras que presentan una menor actividad alorreactiva ⁽²²⁾ .

Los distintos subtipos de células T reguladoras CD4+CD25+ y CD4+CD25-IL10+, las células T gamma delta, las células T dobles negativas (DN-), las células T-NK y las CDs reguladoras controlan las respuestas inmunes mediante anergia o supresión activa de células T alorreactivas⁽²³⁻³¹⁾ . Varios estudios han demostrado un papel crítico de las células reguladoras del donante CD4+CD25+Foxp3+ cuando se produce una EICH aguda. Dichas células suprimen la expansión temprana de las células T del donante alorreactivas y su capacidad para inducir EICH sin abolir el efecto injerto contra leucemia ^(32,33) . Sin embargo, estudios posteriores revelan que la coexpresión de CD4 y CD25 es insuficiente para reducir la EICH. Parece que la presencia de ARNm para Foxp3 está significativamente disminuida en las células mononucleares de sangre periférica (SP) de los pacientes con EICH aunque esta expresión no es específica de células T con fenotipo regulador^(34, 35) .

Las células del huésped NK.1+ son otro tipo celular que ha mostrado capacidad para suprimir la EICH en un modo dependiente de IL4 ⁽³⁶⁾ . Las células NK del donante son también capaces de afectar a la EICH a través de la vía de las perforinas que depende de IFN γ , reduciendo la cantidad de CPAs o mediante la secreción de factor β de crecimiento transformante (TGF- β) ⁽³⁷⁾ .

Las CPAs y la activación de células T producen una cascada intracelular que produce transcripción de genes, incluyendo los de las citoquinas y sus receptores. Las citoquinas Th1 (IFN gamma, IL2 y TNF- α) están implicadas en la fisiopatología de la EICH aguda. La producción de IL2 por las células T del donante constituye una de las principales dianas para la profilaxis y tratamiento de la EICH, actuando a este nivel fármacos como los inhibidores de calcineurina (ciclosporina (CsA) o tacrolimus (FK506)) y anticuerpos monoclonales contra la IL-2 y su receptor (CD25). Sin embargo, datos emergentes señalan el papel clave de la IL2 es la generación y mantenimiento de las células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+, lo que sugiere que la

prolongada interferencia con esta interleucina puede tener consecuencias a largo plazo en el desarrollo de tolerancia inmunológica ⁽³⁸⁻⁴¹⁾. IFN gamma puede jugar también un papel en la severidad de la EICH en los distintos órganos dianas. Las citoquinas Th1 pueden ser reguladoras o inductoras de la EICH dependiendo del grado de disparidad HLA, la intensidad del acondicionamiento y los subtipos de poblaciones T implicados después del trasplante. De ahí que, aunque la tormenta de citoquinas iniciada en la primera fase se correlacionan con el desarrollo de EICH aguda, la polarización temprana Th1 de las células del donante podría a largo plazo atenuar la EICH, lo que sugiere que cantidades de citoquinas fisiológicas y adecuadas son críticas para la inducción de la EICH mientras que una inadecuada producción (muy baja o muy alta) podría modular la EICH a través de mecanismos negativos de retroalimentación sobre las células T del donante activadas ⁽⁴²⁻⁴⁷⁾.

Diferentes citoquinas que polarizan las células T hacia una actividad Th2 tales como IL4, G-CSF, IL18, IL11 y fármacos como sirolimus pueden reducir la EICH. A pesar de todo, las subpoblaciones Th1 y Th2 pueden ocasionar daño en diferentes órganos dianas y algunos estudios no son capaces de demostrar un efecto beneficioso de la polarización Th2 en EICH aguda. El paradigma Th1/Th2 en la inmunopatogénesis de la EICH aguda ha sido ampliamente revisado, aun así es complejo e incompletamente conocido ⁽⁴⁸⁻⁵⁶⁾.

La IL-10 juega un papel clave en la supresión de la respuesta inmune pero su papel en la regulación de la EICH experimental no está bien definido, aunque parece que existe una asociación entre los polimorfismos genéticos de IL-10 y la severidad de la EICH aguda. TGF β , otra citoquina supresora, suprime la EICH aguda pero exacerba la EICH crónica. El papel de otras citoquinas, como IL-7, que promueve la reconstitución inmune, o de IL-13 no está claro. Tampoco se conoce el valor de las células Th17 en este contexto ⁽⁵⁷⁻⁶³⁾.

Las células T del donante migran a los tejidos linfoides, reconocen antígenos en células presentadoras del huésped o del donante y son activadas. Salen posteriormente del tejido linfoide y se dirigen a órganos dianas en los que ocasionan daño tisular. Las interacciones moleculares necesarias para la migración de las células T y el papel de los órganos linfoides durante la EICH

aguda es actualmente foco de interés. Las citoquinas juegan un papel clave en la migración de órganos linfoides y a sus dianas tisulares. Algunas citoquinas tales como CCL2, CXCL2, CXCL9-11, CCL17 y CCL27 están sobreexpresadas y pueden jugar un papel crítico en la migración de subpoblaciones linfocitarias a órganos dianas como el hígado, el bazo, la piel y los pulmones durante la EICH aguda. Los linfocitos T CXCR3+ y CCR5+ causan EICH aguda en el hígado y en el intestino ⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾. La expresión de CCR5 parece clave para explicar la migración de células T reguladoras en la EICH. Además de las citoquinas y sus receptores, la expresión de selectinas, integrinas y sus ligandos también regula la migración de células inflamatorias a órganos dianas. Por ejemplo, la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 7$ y su ligando Mad CAM-1 es importante para reclutar linfocitos T del donante en las placas de Peyer y para la iniciación de la EICH intestinal ⁽⁶⁹⁾. También las interacciones con $\alpha L\beta 2/ICAM1,2,3$ y $\alpha 4\beta 1/VCAM2$ son importantes para el reclutamiento en pulmón e hígado en los TPH experimentales ⁽⁶⁴⁾. La expresión de CD62L en las células T reguladoras del donante es crítica para su función en la EICH aguda, lo que sugiere que su migración a tejidos secundarios es importante para sus efectos regulatorios. Se especula con que el requerimiento migratorio de células T del donante a órganos linfáticos específicos (por ejemplo, las placas de Peyer) podría depender de otros factores tales como el régimen de acondicionamiento y el medio inflamatorio ⁽⁷⁰⁾ (figura 3).

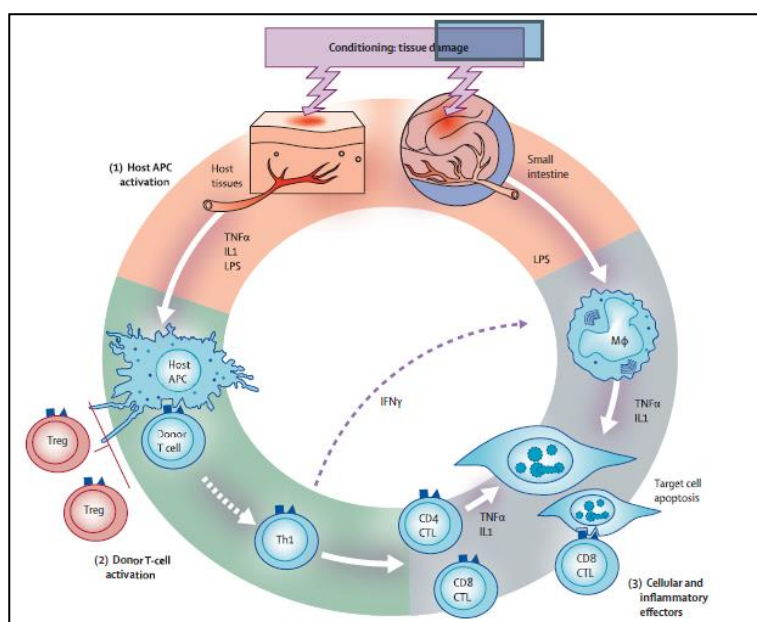


Figura 3. Fisiopatología de la EICH, subpoblaciones celulares implicadas.³

1.1.3. Fase efectora de la EICH.

La fase efectora que genera el daño en el órgano diana de la EICH consiste en una cascada compleja en la que participan diversos tipos celulares que modulan las respuestas inflamatorias actuando de forma simultánea o sucesiva. Además, participan en ella citoquinas inflamatorias que se liberan en el tejido tras la actuación de otras citoquinas especializadas en el reclutamiento de células efectoras. La expresión espaciotemporal de su gradiente podría determinar no sólo la severidad de la EICH sino de los órganos afectados (piel, hígado e intestino) ^(64,71).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) son los principales efectores de la EICH a través de una serie de vías, tales como la del ligando Fas-Fas (FasL), la de la granzima-perforina o exocitosis de gránulos o la de receptores de TNF como DR, entre las que se encuentra la del ligando inductor de la apoptosis mediada por TNF (TRAIL:ligando DR4,5) o la de los inductores débiles de la apoptosis similares a TNF (TWEAK, ligando DR3) ^(72,77). La implicación de estas moléculas en la EICH ha sido testada utilizando células donantes en las que se ha bloqueado el resto de las vías.

La perforina es almacenada en los gránulos de los CTL y células NK junto a la granzima y otras proteínas. Tras el reconocimiento de una célula diana a través de la interacción TCR-CMH, la perforina es segregada e insertada en la membrana celular formando "poros perforantes" que permiten el paso de las granzimas al interior de las células dianas. Esta entrada induce la apoptosis a través de efectores como las caspasas⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. El trasplante de células T deficientes en perforinas se caracteriza por un marcado retraso del inicio de la EICH en aquellos que sólo existe disparidad en MiHA, cuando existe disparidad CHM y MiHA y cuando existen incompatibilidades aisladas HLA clase I o clase II. Aunque la mortalidad y los signos histológicos de la EICH pueden inducirse en ausencia de perforinas, parece que su acción es muy importante en lo que se refiere determinados tipos celulares como los

³ Tomado de la siguiente publicación: Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, et al. Graft versus host disease. The Lancet 2009 373(2): 1550-1561.

linfocitos T CD8+, de forma que, en modelos experimentales de trasplante con disparidad CMH en los que estas células son deficientes en perforinas o granzima B, se produce menos mortalidad. Esta vía, sin embargo, parece menos importante en comparación con la vía Fas/Fas L en la EICH mediada por CD4⁽⁸¹⁻⁸⁶⁾.

La unión a Fas produce también la formación de complejos de señalización inductores de muerte que también activan las caspasas. Fas, un receptor de la familia TNF, se expresa en muchos tejidos incluyendo los órganos dianas de la EICH⁽⁸⁷⁾. Su expresión puede ser estimulada por citoquinas inflamatorias tales como IFN gamma y TNF alfa durante la EICH. Fas L está también incrementado en las células T del donante, de forma que se ha observado que las células T deficientes en esta molécula producen menos EICH en el hígado, en la piel y en los órganos linfoides⁽⁸⁸⁾. Parece que esa vía es muy importante en la EICH hepática debido a la sensibilidad de los hepatocitos a la citotoxicidad mediada por Fas, lo que se ha confirmado en modelos murinos de hepatitis así como mediante anticuerpos anti-Fas L que disminuyen el daño hepático de la EICH. Aunque todo ello no ha sido demostrado en modelos de EICH intestinal, parece que la vía Fas-Fas L puede tener un papel en este órgano diana debido a que los linfocitos epiteliales intestinales presentan un potencial aumentado de muerte mediada por Fas L⁽⁸⁹⁾. Se han objetivado niveles aumentados de Fas L soluble y de Fas en EICH aguda^(90,91).

La utilización de un ratón deficiente en perforina-granzima y en Fas L proporciona una oportunidad para dirigir los estudios hacia otras vías efectoras capaces de inducir patología ligada a la EICH en los órganos dianas. La participación de otra vía de señalización de receptores de muerte, TNF/TNFR, ha sido también evaluada. Los datos experimentales sugieren que esta vía es fundamental para la EICH gastrointestinal. Se ha identificado además otra familia de receptores ligada a TNF inductora de apoptosis, que incluye TWEAK, TRAIL y LTβ/LIGHT, que parecen tener un papel en la EICH y en la enfermedad injerto contra leucemia⁽⁹²⁻⁹⁸⁾.

La molécula perforina y las vías citotóxicas TRAIL están asociadas con la enfermedad injerto contra leucemia mediada por linfocitos T. Los datos experimentales apoyan fundamentalmente la participación de los linfocitos T CD8+, fundamentándose en el papel dominante de esta población efectora en la mayoría de los modelos murinos ⁽⁷²⁾. Sin embargo, las células T CD4+ pueden mediar el efecto injerto contra leucemia.

Las citoquinas inflamatorias producen amplificación del daño local y en la promoción de la inflamación, llevando a la destrucción del órgano diana en el receptor. Los macrófagos, activados por IFN y durante la fase de presentación de antígenos, producen citoquinas inflamatorias como IFN α e IL-1 cuando se estimulan por una señal secundaria ⁽⁹⁹⁾. Este estímulo puede proceder del receptor like-Toll (TLRs) a través de productos microbianos tales como el LPS, debido al daño derivado del régimen de acondicionamiento y la EICH intestinal ^(100,101). El reconocimiento inmune a través de TLR y de vías no TLR (como NOD) por el sistema inmune innato controla la activación de las respuestas inmunes adaptativas ⁽¹⁰²⁾. Recientes estudios sugieren una posible asociación de los polimorfismos TLR/NOD y la severidad de la EICH ^(103,104). LPS y otros estímulos innatos pueden actuar sobre los linfocitos, queratinocitos, fibroblastos de la dermis y macrófagos asociados al intestino, produciendo efectos proinflamatorios que pueden jugar un papel directo en el daño del órgano diana. Datos experimentales en TPHs con disparidad CMH sugieren que bajo ciertas circunstancias los mediadores inflamatorios son suficientes para causar daño de EICH, incluso en ausencia de daño directo inducido por CTL. La severidad de la EICH parece estar relacionada con el nivel de activación de la inmunidad innata y adaptativa así como con la liberación de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 y óxido nítrico ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾. Dichas citoquinas son producidas por una abundancia de tipos celulares durante los procesos de inmunidad innata y adaptativa; tienen efectos sinérgicos, pleiotrópicos y redundantes en la activación de las fases de la EICH. El daño orgánico podría ser inhibido mediante la infusión de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α , de modo que la mortalidad se reduciría del 100 al 50% mediante un antagonista de esta citoquina ⁽¹⁰⁶⁾. Datos experimentales sugieren que TNF α está implicado en diversas etapas de la fisiopatología de la EICH. En primer

lugar, TNF α causa caquexia, que es una característica de la EICH; en segundo lugar, induce maduración de las células dendríticas que afecta a la presentación de aloantígenos; en tercer lugar, recluta efectores T, neutrófilos y monocitos en los órganos dianas a través de la inducción de citoquinas inflamatorias; y, en cuarto lugar, causa daño directo por inducción de apoptosis y necrosis. El TNF α activa las células T del donante directamente a través de las vías de señalización TNFR1 y TNFR2. La primera de ellas promueve respuestas T alorreactivas y la segunda es crítica para la EICH intestinal ⁽¹⁰⁹⁾. Además de ser también una molécula efectora en la piel y en los tejidos linfoides⁽¹¹⁰⁾, puede estar implicada en la EICH hepática promoviendo la migración de células efectoras al hígado. Diversos estudios demuestran niveles aumentados de TNF α en el suero o niveles elevados de ARNm en células mononucleares de SP en pacientes con EICH u otras complicaciones endoteliales tales como la enfermedad venooclusiva hepática (EVOH) ⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾. Los ensayos fase I y fase II con antagonistas de TNF α reducen la severidad de la EICH, lo que pone de manifiesto que se trata de un efector relevante ^(115,116).

La segunda citoquina proinflamatoria que tiene un papel importante en la fase efectora de la EICH es la IL-1 ⁽¹¹⁷⁾. Su secreción predominante se produce en el bazo y en la piel, habiéndose objetivado aumento de ARNm para IL-1 en células mononucleares de SP ⁽¹¹⁸⁾. Se ha obtenido evidencia indirecta de su papel en la EICH en receptores murinos sometidos a TPH. Los ratones que reciben IL-1 desarrollan un síndrome de agotamiento que se asemeja a una forma acelerada de la EICH y presentan una mortalidad incrementada. Sin embargo, la administración intraperitoneal de una forma soluble del receptor de la IL-1 puede revertir el desarrollo de la EICH en la mayoría de los animales, lo que mejora su supervivencia. A pesar de ello, el fármaco no ha dado resultado como profilaxis de EICH en ensayos randomizados^(119,120).

Como resultado de la activación durante la EICH, los macrófagos producen óxido nítrico, que contribuye al efecto deletéreo de la EICH en los tejidos dianas. El óxido nítrico también inhibe los mecanismos de reparación de la destrucción tisular impidiendo la proliferación de células madres en la piel y en el intestino. En humanos y en modelos animales, el desarrollo de la EICH

está precedido por un incremento en los niveles séricos de los productos de oxidación del óxido nítrico ⁽¹²¹⁻¹²⁶⁾(figura 4).

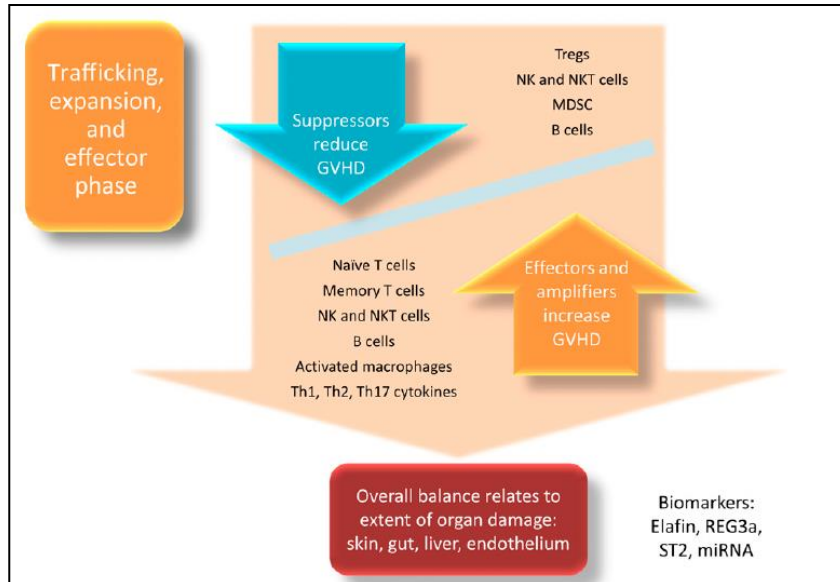


Figura 4. Expansión, circulación y fase efectora de la EICH.⁴

1.2. Fisiopatología de la EICH crónica.

La enfermedad injerto contra huésped crónica (EICHc) se inicia con la expansión de linfocitos T del donante en respuesta a alo o autoantígenos, que escapan a los mecanismos de delección a nivel tímico o en sangre periférica⁽¹²⁷⁾.

El papel de la auto o alorreactividad en el contexto de la EICHc constituye un área de debate que permanece sin clarificar. Así, la alorreactividad frente a antígenos menores de histocompatibilidad explica la EICHc como una manifestación o fase tardía de EICHa. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la EICHc frecuentemente se asemejan a las descritas en el contexto de enfermedades autoinmunes. En este sentido, la EICHc depende de la persistencia de linfocitos T que no desarrollan una respuesta inmunotolerante frente a antígenos del receptor.

⁴ Tomado de la siguiente publicación: Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. Blood 2014 124(3): 363-372.

Los avances en el conocimiento sobre la fisiopatología de la EICH crónica no se han producido, en parte, debido a la ausencia de apropiados modelos experimentales. Aunque algunos modelos murinos producen ciertos rasgos de EICH crónica, tales como la fibrosis cutánea y pulmonar, la nefritis lúpica o el daño hepático⁽¹²⁸⁾, en contraste con dichos modelos, la cinética de la EICH crónica en humanos es más lenta. Incluso cuando la EICH crónica aparece "de novo" y en ausencia de una activa inmunosupresión, no es posible definir el impacto de la profilaxis de la EICH y de la EICH aguda subclínica en el desarrollo de la EICH crónica.

1.2.1. EICH crónica y compatibilidad HLA.

Existen pocos estudios que correlacionen la disparidad HLA con la incidencia o severidad de la EICH crónica. Algunos estudios han demostrado una asociación entre ésta y la disparidad HLA clase I (A,B y C)⁽¹²⁹⁻¹³¹⁾, aunque sólo unos pocos modelos experimentales con disparidad CMH remedan algunos rasgos de la EICH crónica. Por el contrario, los datos clínicos emergentes muestran una fuerte correlación entre la presencia de respuestas inmunes contra miHAs expresados ubicuamente y EICH crónica. Dado que la EICH crónica sucede después de un TPH alogénico, la EICH aguda es el principal factor de riesgo y es posible que sea causada por células T que han desarrollado una estimulación crónica antigénica debido a la presencia de miHAs ubicuos. La equivalencia de sus rasgos clínicos con los de las enfermedades autoinmunes podría ser el resultado del daño crónico tisular en órganos diana, debida a antígenos menores en la EICH crónica y a autoantígenos no polimórficos en las enfermedades autoinmunes^(132,133).

Debido al fallo de los mecanismos reguladores (como consecuencia de la EICH aguda o su tratamiento y/o profilaxis), es posible que las células T del donante que reconocen epitopos de mi HAs puedan causar una EICH crónica a largo plazo.

A pesar del evidente estado inflamatorio, tampoco hay datos experimentales claros sobre el papel de las citoquinas proinflamatorias en la EICH crónica, aunque se observan niveles elevados de TNF α y de transcripción de IFN γ , que podrían predecir el inicio de EICH crónica extensa⁽¹³⁴⁾. Algunos estudios

muestran también que los polimorfismos en IL-10, IL-1 alfa, IL-1Ra e IL-6 muestran asociación con EICH crónica ⁽¹³⁵⁾.

1.2.2. EICH crónica y células presentadoras de antígenos.

Al contrario que en EICH aguda, se conoce poco sobre los factores que inician la EICH crónica, lo que es debido en parte a la ausencia de modelos animales satisfactorios. Dado que la EICH aguda previa es el mayor factor de riesgo para la aparición de EICH crónica, el daño y la inflamación causados por la EICH aguda y su tratamiento podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la EICH crónica. La EICH sucede después, quizás tras una completa reconstitución inmune, y esto constituye una razón para que la presentación por CPA donantes sea importante en su patogénesis.

Todo ello se sustenta en las siguientes observaciones: 1) hay una correlación clínica entre la presencia de un elevado número de células mononucleares en los progenitores infundidos y un mayor riesgo de EICH crónica ^(101,136,137); 2) los modelos experimentales que demuestran la naturaleza "autoinmune" de la EICH crónica también sugieren un papel de las CPA derivadas del donante ⁽¹³⁸⁾; y 3) datos experimentales recientes demuestran en modelos de EICH crónica mediada por Células T CD4+ con compatibilidad HLA y disparidad en miHAs que, aunque tanto las CPA donantes como receptoras pueden iniciar la EICH crónica, sólo las donantes tienen un papel dominante en EICH crónica intestinal ⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾. Menos es conocido sobre las subpoblaciones de CPAs que inducen o mejoran la EICH crónica.

1.2.3. EICH crónica y células T.

Las células T del donante son un requisito absoluto para el desarrollo de EICH aguda y crónica. El receptor T (TCR) de estas células reconoce aloantígenos HLA/miHAs o antígenos no polimórficos directamente presentados por las CPA del huésped o indirectamente presentados por las CPA del donante. La activación y diferenciación T requiere la unión del TCR y la coestimulación a través de una segunda señal mediante la interacción de moléculas coestimuladoras de las células T con sus ligandos en las CPAs. Por ejemplo, OX40 que se expresa en células CD4 se asocia con el inicio de EICH

crónica^(142,143). Un estudio reciente muestra que la coestimulación dependiente de CD80/86 es crítica para la inducción de EICH crónica. También se demuestra que esta coestimulación es suficiente para ocasionar EICH crónica cutánea pero se requiere también la CD40 para ocasiona EICH crónica intestinal ⁽¹³⁹⁾. Estos datos sugieren que existen distintos requerimientos coestimulatorios según el daño del órgano diana.

Como hemos comentado anteriormente, las moléculas HLA clase I (A,B y C) estimulan a las células T CD8+ y las de clase II (HLA-DR, -DP, -DQ) estimulan a las células CD4+. Los papeles individuales de estas células en EICH aguda y crónica han sido exhaustivamente estudiados en modelos de ratón. Las células CD4+ vírgenes, a través del contacto con su antígeno presentado por las CPAs, se diferencian en Th1/Th2/Th17 o en células T reguladoras (Tr/Th3), dependiendo de las citoquinas del medio. Si bien las citoquinas Th1(IFN gamma, IL-2 y TNF alfa) están implicadas en la fisiopatología de la EICH aguda, la producción de IL-2 por las células T del donante es la principal diana en las aproximaciones profilácticas y terapéuticas en EICH aguda y crónica. Datos emergentes indican el importante papel de la IL-2 en la generación y mantenimiento de las células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+, sugiriendo que la prolongada interferencia con IL-2 puede tener consecuencias en el desarrollo a largo plazo de tolerancia a un TPH alogénico ⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁷⁾. En lo que se refiere a EICH crónica, parece que la polarización Th1 reduce la EICH crónica y el fenotipo Th2 la estimula^(148,149), aunque el paradigma Th1/Th2 en la inmunopatogénesis de la EICH es complejo e incompletamente comprendido.

Las células T reguladoras secretan IL-10 o TGF- β (Th3). Algunos estudios han demostrado una fuerte asociación entre los polimorfismos de IL-10 y la severidad de la EICH ⁽¹⁵⁰⁾. TGF-beta, una citoquina supresora que atenúa EICH aguda y exacerba EICH crónica ⁽¹⁵¹⁾.

Varios estudios han demostrado un papel supresor en EICH aguda y crónica para las células T reguladoras del donante CD4+CD25+Foxp3+ ⁽¹⁵²⁾. En pacientes con EICH crónica, existe un número reducido de células T reguladoras y deficiente expresión de Foxp3 en sangre periférica y en biopsias de mucosas ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾. Sin embargo, un estudio clínico encuentra que los niveles

de ARNm para Foxp3 en el compartimento de las células T CD25+ no son predictores de EICH crónica⁽¹⁵⁶⁾. Una posible explicación sería, teniendo en cuenta el impacto negativo de los inhibidores de calcineurina en las células T reguladoras, que la EICH crónica se produzca o se exacerbe como consecuencia de la supresión de las células T del donante aloreactivas tanto citopáticas como reguladoras.

Los datos experimentales son consistentes con que las células T aloreactivas vírgenes (CD62L+) se asocian con EICH aguda, no sucediendo lo mismo con las células T memoria. La expresión del marcador CD62L propio de linfocito T virgen es crítica para la modulación de la EICH por las células T del donante reguladoras^(157,158). En contraste, se ha descrito que las células T memoria del donante activadas por aloantígenos inducen colitis crónica y daño hepático, lo que es más concordante con los hallazgos habituales de la EICH crónica⁽¹⁵⁹⁾. Un subtipo de población T memoria CD8+CD62hi CD44lo que se desarrolla durante la EICH aguda es capaz de autorrenovarse e inducir EICH con rasgos parecidos a la forma crónica cuando se transfiere a receptores⁽¹⁶⁰⁾. El mismo grupo sugiere que las células T CD4+del huésped derivadas del timo también producen cuando son infundidas un cuadro clínico similar a la EICH crónica. Otras observaciones han evaluado la correlación entre la expresión de CD6 y CD44hiCCR7+en las células T memoria CD8+ y CD4+ del donante, sugiriendo un papel de las mismas en ambos tipos de EICH⁽¹⁶¹⁾.

El daño tímico por el tratamiento de acondicionamiento y la atrofia asociada a la edad interrumpe la educación en el timo de las células T y favorecería el desarrollo de EICH crónica por la emergencia de células T autorreactivas dependientes del timo⁽¹⁶²⁾. Se ha demostrado recientemente que las células T del donante derivadas de la médula ósea y dependientes del timo que escapan de la selección negativa tienen la capacidad de producir EICH crónica, que se evita con la timectomía de los receptores previos al trasplante⁽¹³⁸⁾. Sin embargo, datos procedentes de modelos animales irradiados subletalmente demuestran que el timo del huésped no es necesario para el desarrollo de un cuadro autoinmune similar a la EICH crónica⁽¹⁶³⁾. En conjunto, podemos afirmar que, si bien las células T del donante maduras procedentes del aloinjerto son necesarias y suficientes para producir EICH aguda, en la

inducción de la EICH crónica juegan un papel tanto estas células como células T del donante generadas a partir de las células madres hematopoyéticas infundidas y dependientes del timo del huésped.

1.2.4. EICH crónica y linfocitos B.

Existe un papel potencial de las células B en EICH crónica con el que se ha especulado ⁽¹⁶⁴⁾. Se basa fundamentalmente en cuatro observaciones: 1) la presencia de anticuerpos frente antígenos de histocompatibilidad codificados en el cromosoma Y⁽¹³³⁾; 2) niveles aumentados de células B con respuestas TLR9 alteradas⁽¹³⁴⁾; 3) niveles incrementados del factor activador de células B (BAAF), que promueve la supervivencia y activación de células B⁽¹⁶⁵⁾; y 4) niveles aumentados en modelos animales de autoanticuerpos⁽¹⁶⁶⁾. Además, existen datos emergentes sobre respuestas clínicas con rituximab que apoyan el papel patogénico de los linfocitos B en EICH crónica^(140,141,167). Sin embargo, desconocemos si participan en el proceso como efectores, inductores o amplificadores .

1.3. Clínica de la EICH.

1.3.2. EICH aguda

Clásicamente, la EICH aguda se define como aquella que se produce antes de los 100 días antes del trasplante y la EICH crónica es la que aparecía posteriormente⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾. La EICH hiperaguda, aunque infrecuente, es una forma grave que ocurre en la primera semana postinfusión y se caracteriza por fiebre, eritrodermia generalizada ,descamación, hepatitis, inflamación y síndrome de capilaritis⁽¹⁷²⁾ . A raíz de la publicación de los criterios de consenso del "National Institute of Health Consensus Development Project" (NIH), se describen también otras formas de expresión de la EICH: la EICH aguda tardía, que se produce después del día +100 postrasplante y un síndrome de superposición con rasgos de EICH aguda y crónica. Estos dos síndromes se producen con mayor frecuencia después de un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida ^(173,174). Esta conferencia establece

que son los signos y síntomas los que definen la EICH aguda o crónica y no su momento de aparición.

La EICH aguda es una entidad clínico-patológica, que se produce por el efecto citotóxico de los linfocitos del donante contra las células del huésped (células epiteliales de piel y mucosa, células de los conductos biliares, de las criptas en la mucosa intestinal o de la vía aérea)⁽¹⁾. Los principales órganos dianas de la EICH son: la piel (81% de los pacientes), el tracto gastrointestinal (54%) y el hígado (50%)⁽¹⁶⁸⁾.

a) Piel:

A menudo la primera manifestación de la EICHa es un rash pruriginoso, maculopapuloso, que aparece en el día entre la segunda y la quinta semana post-infusión, generalmente coincidiendo con el injerto leucocitario; puede ser pruriginoso o doloroso y generalmente comienza con eritema en base del cuello, orejas, hombros, palmas y plantas, recordando a una quemadura solar. La necrosis epidérmica es la forma más severa con formación de bullas y separación epidérmica similar a la que se observa en la epidermiolisis tóxica. La afectación cutánea se clasifica en 4 grados, según la severidad (tabla 2). El diagnóstico diferencial de la EICHa cutánea incluye los efectos de la quimio ó radioterapia, alergia a fármacos e infecciones virales; el diagnóstico debe confirmarse histológicamente ⁽¹⁷⁵⁾

b) Hígado

La afectación hepática por EICH agudo es infrecuente en ausencia de afectación cutánea. Es característica la ictericia con incremento de bilirrubina conjugada y fosfatasa alcalina, reflejo del daño a nivel de los canalículos biliares. Suele observarse también un incremento de transaminasas, aunque pueden permanecer en niveles normales El diagnóstico diferencial incluye: enfermedad veno-oclusiva hepática, infección (generalmente por virus), sepsis y toxicidad por fármacos como metotrexate (MTX), ciclosporina-A (CSA) y tacrolimus. Es infrecuente el fallo hepático debido únicamente a EICH aguda y así, la presencia de hipoalbuminemia debe hacer sospechar afectación del tubo digestivo o balance nitrogenado negativo más que insuficiencia hepática⁽¹⁷⁶⁾. La

biopsia solo será necesaria en aquellos casos en los que no haya manifestaciones de EICH en otros órganos aunque si ésta es necesaria, los cambios histológicos observados en los conductos biliares son característicos.

c) Intestinal

La afectación intestinal es habitualmente la más severa y difícil de tratar. Las manifestaciones clínicas incluyen: anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal de tipo cólico y en casos graves hemorragia e íleo. En cuanto a las características organolépticas de la deposición, ésta suele ser verdosa, pudiendo presentar mucosidad y células de descamación. El volumen de la deposición puede ser muy importante en los casos severos, siendo necesarios una terapia trasfusional, fluidoterapia y soporte nutricional adecuados⁽¹⁷⁶⁾. El diagnóstico diferencial incluye: toxicidad gastrointestinal inducida por el régimen de acondicionamiento o infecciones víricas o bacterianas, por lo que es necesario realizar estudios microbiológicos seriados. Los hallazgos endoscópicos son variables y a menudo inespecíficos, desde la normalidad al edema y el despegamiento de la mucosa; las lesiones pueden ser más prominentes en el ciego, íleon y colon ascendente pero pueden afectar también al estómago, duodeno y recto. La biopsia es obligatoria para el establecer el diagnóstico definitivo de EICHa digestiva. Algunos pacientes presentan una variante de EICH digestiva con afectación predominantemente alta, caracterizada por anorexia, dispepsia, náuseas y vómitos, sin diarrea; estos pacientes suelen responder bien al tratamiento inmunosupresor aunque con frecuencia desarrollan EICH crónica⁽¹⁷⁶⁾

d) Hematopoyesis y sistema inmune

La EICHa afecta también al tejido linfoide y así se observa en los ganglios linfáticos una disminución de los centros germinales y anomalías en las poblaciones linfoides, como inversión del cociente CD4/CD8⁽¹⁷⁷⁾. Estas alteraciones aumentan el riesgo de desarrollar infecciones severas postrasplante.

e) Afectación ocular

Se han descrito síntomas oculares en pacientes con EICHa consistentes en fotofobia, conjuntivitis hemorrágica, formación de pseudomembranas y logofthalmos y esta manifestación se ha asociado a peor supervivencia⁽¹⁷⁸⁾

El grado de afectación de los principales órganos (piel, hígado y tubo digestivo) se combina para dar lugar a un sistema de clasificación (tabla 1)⁽¹⁸¹⁻¹⁸³⁾ que permite predecir la supervivencia de los pacientes. Una posible limitación de este sistema es la escasa concordancia entre médicos. A pesar de ello, la clasificación de Glucksberg continúa siendo la más empleada.

Tabla 1: Estadiaje EICH agudo.

Órgano	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Piel	Rash <25% SC	Rash 25-50% SC	Rash >50% SC	Eritrodermia generalizada con bullas
Hígado	Bilirrubina 2-3mg/dl	Bilirrubina 3,1-6mg/dL	Bilirrubina 6,1/15mg/dL	Bilirrubina >15mg/dL
Intestino	Diarrea >500mL/día	Diarrea >1000mL/día	Diarrea >1500mL/día	Diarrea >2000mL/día o dolor abdominal severo con o sin parálisis

1.3.2. EICH crónica.

La EICH crónica es la principal causa de muerte tardía no relacionada con la recaída después del trasplante. La mediana de aparición del EICHc es de 201 días tras el trasplante en caso de donante emparentado HLA idéntico, 159 días tras trasplante de donante no emparentado con alguna disparidad HLA y de 133 días tras trasplante de donante no emparentado. Su presentación puede ser progresiva (EICH aguda activa que se transforma en EICH crónica), quiescente (EICH aguda que se resuelve completamente y posteriormente aparece la EICH crónica) o de novo.

La clasificación clásica del EICHc divide a los pacientes en limitado (aquellos que no requieren tratamiento) o extenso (que requieren tratamiento inmunosupresor) (tabla 4)^(184,185).

Tabla 4: Clasificación de la EICHc en limitada o extensa:

A.- EICH crónica limitada: (1 y/o 2)

Afectación cutánea localizada (< 50% de la superficie corporal) y/o

Afectación hepática limitada (alteración de tests de función hepática con bilirrubina total < 3 mg/dl)

B.-Se considera EICHc extensa:

- Afectación cutánea extensa (\geq 50% de la superficie corporal), o
- Afectación cutánea y/o hepática limitada asociado a la presencia de \geq 1 de los siguientes criterios:
 - Biopsia hepática con histología compatible con EICHc (hepatitis crónica agresiva, puentes de necrosis, cirrosis hepática) con bilirrubina \geq 3 mg/dl
 - Test de Schirmer positivo (< 5 mm)
 - Biopsia de mucosa oral o glándula salivar con histología diagnóstica de EICHc
 - Alteración pulmonar compatible con bronquiolitis obliterante sin evidencia de causa viral en el estudio histológico
 - Afectación intestinal: malaabsorción y/o pérdida de peso > 15% debido a anorexia sin causa evidente excepto la presencia de EICHc.

La clasificación propuesta por el "National Institute of Health Consensus Development Project"(NIH) establece 3 grupos de pacientes en función del número de órganos afectados por la EICHc y el grado de afectación de cada órgano. Si bien se recomienda tener una confirmación histológica ésta no es obligatoria si el paciente presenta al menos un criterio "diagnóstico" (tabla 5). A cada órgano se le asigna una puntuación de 0 a 3 según el grado de severidad de la afectación por EICHc (tabla 6), de manera que la EICHc se divide en: (1) leve: afectación de uno o dos órganos (excepto el pulmón) con una puntuación máxima de 1; (2) moderada: 3 ó más órganos afectados con una puntuación máxima de 1 o siempre que un órgano tenga

una puntuación de 2 (salvo el pulmón en el que es suficiente una puntuación de 1); (3) grave: cuando al menos 1 órgano alcanza una puntuación de 3 (o bien el pulmón alcanza una puntuación de 2). Algunos criterios han sido recientemente actualizados (tablas 5,6 y 7)⁵.

Desde el punto de vista histológico se definen 3 categorías: no EICH, posible y probable. En el primer caso no hay evidencia de EICH, en el segundo la hay pero existen otras posibles causas y en el tercero hay evidencia sin otra causa o diagnóstico competitivo.

Tabla 5. Clasificación de la EICH en aguda o crónica

Categoría	Momento de aparición	Síntomas característicos de EICHa	Síntomas característicos de EICHc
EICHa			
Clásica	< 100 días postrasplante	Sí	No
Persistente, recurrente, tardía	> 100 días postrasplante	Sí	No
EICHc			
Clásica	Sin límite temporal	No	Sí
Mixto compuesto	Sin límite temporal	Sí	Sí

⁵ Tomadas de las siguientes publicaciones: 1) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005; 11: 945-55. 2) Jagasia N, Greinix H, Arora M et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood and Marrow transplant 2015; 21: 389

Tabla 6: Criterios diagnósticos de EICHc

Criterios:	Diagnóstico	Característico	Otros	Común con EICHa
Piel	Poiquilodermia; liquen plano Cambios escleróticos Morfea, liquen escleroso	despigmentación	Alt sudación ictiosis Queratosis pilaris Hipo / hiperpigmentación	Eritema Rash maculopapular prurito
Uñas		Distrofia Estrías longitudinales Uñas quebradizas Onicolisis Pterigium ungueal pérdida ungueal		
Cuero cabelludo		Alopecia cicatricial Lesiones descamativas Lesiones papulo-escamosas	Fragilidad capilar, Encanecimiento prematuro	
Boca	Lesiones liquenoides	Xerostomía, mucocele, atrofia mucosa pseudomembranas, úlceras		Gingivitis Mucositis Eritema dolor
Ojos		Sequedad, dolor, conjuntivitis cicatricial, queratoconjuntivitis seca (requiere Schirmer)	Fotofobia, hiperpigmentación periorbital blefaritis	
Genitales femenino	Liquen plano-like, liquen escleroso-like, cicatrices o estenosis vaginal, sinequias en clítoris / labios menores fimosiis o estenosis /	Erosión, fisuras, úlceras		

	cicatrices de uretra o meato			
masculino				
Digestivo	Membrana esofágica		Insuficiencia pancreática exocrina	Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, retraso crecimiento (niños)
	Estenosis hasta 1/3 medio (documentados por endoscopia o contraste)			
Hígado				Bilirrubina total, fosfatasa > 2 veces el límite superior de la normalidad (N) AST ó ALT > 2 x N
Pulmonar	Bronquiolitis obliterante (BO) diagnosticada por biopsia	BO diagnosticada por espirometría y radiología		Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
Muscular, fascia	Fascitis, rigidez o contracturas articulares secundarias a esclerosis	Miositis ó polimiositis (requiere biopsia)	edema, calambres, artralgia, artritis	
Hematológico e inmunológico			Trombocitopenia, eosinofilia, linfopenia, hipo/hipergammaglobulinemia, autoanticuerpos	
Otros			Ascitis, derrame pleural o pericárdico, neuropatía, síndrome nefrótico, miastenia gravis, alt conducción a nivel cardíaco, miocardiopatía	

Otros indicadores, manifestaciones clínicas o complicaciones relacionadas con EICHc (indicar puntuación 0 a 3 según que el grado de afectación sea leve, moderado o severo)

Membrana esofágica

Derrame pericárdico

Derrame pleural

Ascitis

Síndrome nefrótico

Neuropatía periférica

Miastenia gravis	Miocardiopatía	Eosinofilia > 0.5 x 10 ⁹ /L
Polimiositis	Alteraciones en la conducción	Afectación arteria coronaria
Plaquetas < 100x10 ⁹ / L	Comienzo progresivo	
Otros		

SCA: superficie corporal afectada; AC: actividades cotidianas; PFH: pruebas de función hepática (bilirrubina-BT, fosfatasa alcalina-FA, ALT); QS: queratoconjuntivitis seca; LSN: límite superior de la normalidad; PFP: pruebas de función pulmonar (al FEV1 y DLCO se les asigna un valor de acuerdo al siguiente criterio: > 80% = 1; 70-79% = 2; 60-69% = 3; 50-59% = 4; 40-49% = 5; < 40% = 6)

Tabla 7: Criterios histológicos de EICH

Organo o sistema	Criterios mínimos para EICH agudo o activo	Criterios específicos para EICH crónico
Higado	Valoración global de dismorfia o destrucción de conductos biliares de pequeño calibre, colestasis, inflamación lobular y portal.	Ductopenia, fibrosis portal, colestasis crónica refleja cronicidad pero no es específico de EICH crónico.
Tubo digestivo	Apoptosis en criptas	Destrucción de glándulas, ulceraciones o fibrosis submucosa podría reflejar severidad pero no es específico de EICHc
Piel, en general	Apoptosis en membrane basal / membrane de Malpigio o infundíbulo o raíz de folículo piloso Cambios vacuolares, inflamatorios Satelitosis	
Piel, liquen plano-like		Combinación de ortoqueratosis epidérmica o hipergranulosis o acantosis similar a liquen plano Inflamación, cambios liquenoides o vacuolares en unidades ecrinas
Piel, morfea		Engrosamiento de los depósitos de colágeno en la dermis o sclerosis pandérmica Adelgazamiento y homogeneización de los septos subcutáneos
Piel, liquen escleroso-like		Homogeneización /esclerosis de las papilas dérmicas con depósito de colágeno, melanofagos en la dermis papilar e infiltrado linfocítico.
Piel, fascitis		Engrosamiento de los septos en las fascias con inflamación adyacente / esclerosis subcutánea
Orofaringe /	Infiltración de linfocitos en mucosa (exocitosis) y apoptosis variable.	

conjuntiva Glándulas salivares	Infiltrado linfocitario periductal con daño de los conductos interlobulares, fibroplasia en el estroma periductal, inflamación plasmocítica, destrucción de tejido acinar.
Pulmon	Cicatrices con infiltración eosinofílica en el epitelio respiratorio, reducción de la luz u obliteración de la misma; puede ir precedido de bronquiolitis linfocítica con fibrosis intraluminal.
Riñón	Nefropatía membranosa, enfermedad de cambios mínimos

1.4. Profilaxis y tratamiento de la EICH.

1.4.1. Profilaxis.

Teniendo en cuenta las distintas fases de la EICH, se pueden diseñar estrategias encaminadas a la prevención (actuando fundamentalmente sobre las fases I y II o el tratamiento (manipulando las fases II y III) de la misma ⁽¹⁸⁶⁾. El factor más importante para prevenir la EICH es la elección del donante más adecuado, teniendo en cuenta el grado de compatibilidad HLA, la edad y el sexo del donante, entre otros factores. En relación con el primero de ellos, la compatibilidad HLA, numerosos estudios han confirmado que, en el contexto del trasplante alogénico de donante no emparentado, la identidad en 8 antígenos (o alelos) A, B, C y DRB1 entre donante y receptor permite alcanzar unos resultados clínicos similares a los del trasplante de donante emparentado.

La combinación de un inhibidor de calcineurina, ciclosporina o tacrolimus, con metotrexate constituye aún en la actualidad la pauta de profilaxis estándar. La adición de globulina antitimocítica (ATG) a la profilaxis de EICH se ha evaluado en numerosos estudios prospectivos aleatorizados, siendo la conclusión común a todos ellos que permite reducir de manera significativa el riesgo de EICH aguda y sobre todo crónica y, por tanto, con un impacto favorable en la calidad de vida postrasplante, pero sin incrementar la supervivencia a largo plazo e incluso con descenso de la misma en algún estudio en el contexto del trasplante de intensidad reducida ^(187,188). Otra de las estrategias ampliamente extendidas en la actualidad para la profilaxis de EICH,

especialmente en el contexto de trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida es la combinación de tacrolimus y mofetil micofenolato, si bien algún estudio prospectivo con un escaso número de pacientes concluyó que esta combinación no modifica el riesgo de EICH ni la supervivencia en comparación con inhibidores de calcineurina/ metotrexate (CNI/MTX) pero que permite un injerto hematopoyético más rápido⁽¹⁸⁹⁾. Más recientemente, se ha publicado sobre un total de 500 pacientes que la combinación de rapamicina y tacrolimus incrementa de manera significativa la supervivencia hasta el 70% a 4 años, por lo que numerosos estudios están empleando esta combinación como grupo “control” frente al que comparar nuevas estrategias.

Frente a la depleción inespecífica de linfocitos T, es posible diseñar estrategias de profilaxis cuyo mecanismo de acción sea mucho más selectivo, eliminando únicamente linfocitos activados o en proceso de mitosis, que serían los responsables de la enfermedad injerto contra huésped en fases tempranas del periodo postrasplante inmediato. En este sentido, se posicionarían fármacos como bortezomib⁽¹⁹⁰⁾ o la ciclofosfamida cuya eficacia ha permitido incluso la realización de trasplantes haploidénticos con una tasa de enfermedad injerto contra huésped similar a la de trasplantes con un mayor grado de identidad HLA^(191,192).

1.4.2. Tratamiento.

El tratamiento estándar de la enfermedad injerto contra huésped continúan siendo los esteroides, tanto en el contexto de la EICH aguda como crónica. Tanto en el EICH agudo como en el crónico, el tratamiento tópico constituye una herramienta clave para el control de la sintomatología sin tener que recurrir al incremento del tratamiento sistémico inmunosupresor; en este sentido, la beclometasoma dipropionato ha mostrado su eficacia en estudios prospectivos randomizados en combinación con dosis bajas de 6-metil-prednisolona, aumentando la tasa de respuestas⁽¹⁹³⁾ e incluso la supervivencia a un año en pacientes con EICH agudo digestivo e incluso permite obtener un elevado porcentaje de respuestas en ausencia de tratamiento sistémico con esteroides⁽¹⁹⁴⁾. Igualmente, en el contexto del EICH crónico permite obtener respuestas mantenidas en pacientes con afectación del tubo digestivo⁽¹⁹⁵⁾.

Más allá de la primera línea, no existe un tratamiento que pueda considerarse estándar, ni en el EICH agudo ni en el crónico, si bien en relación con este último se han publicado algunas guías de consenso. Concretamente, la guía británica identifica la fotoaféresis, la pentostatina, el rituximab, el imatinib o los inhibidores de mTOR⁽¹⁹⁶⁾ como opciones válidas dentro de la segunda línea de tratamiento. En esta segunda línea, el grupo alemán incluye también el mofetil micofenolato⁽¹⁹⁷⁾. En todo caso, es importante tener en cuenta el órgano afectado a la hora de seleccionar uno u otro fármaco. Otras estrategias como daclizumab, infliximab u otros anticuerpos monoclonales dirigidos frente a citocinas implicadas en el proceso inflamatorio se proponen como alternativas de tercera línea de tratamiento, con las que es posible obtener tasas de respuesta muy elevadas (67-100%) si bien la supervivencia a medio plazo de estos pacientes se ve afectada por el elevado riesgo de infecciones^(198,199).

2. Vitamina D y sistema inmune.

La vitamina D bioactiva o calcitriol es una hormona esteroidea conocida por su importante papel en la regulación de los niveles de calcio y fósforo así como en la mineralización del hueso. El término vitamina D es impreciso y agrupa a los distintos componentes que forman parte de esta familia de hormonas esteroideas. La vitamina D₃, también conocida como colecalciferol, se genera en la piel de los animales cuando se absorbe la luz solar por una molécula precursora, el 7-dehidrocolesterol. De ahí que la vitamina D no sea una verdadera vitamina, ya que individuos con exposición solar adecuada no requieren suplementación con la dieta. La forma en que se encuentra en la naturaleza se denomina vitamina D₂ o ergosterol. Ninguna de estas formas son activas sino que requieren de una progresiva hidroxilación en el organismo para llegar a su forma activa, el 1,25 dihidroxicolecalciferol. (figura 5).

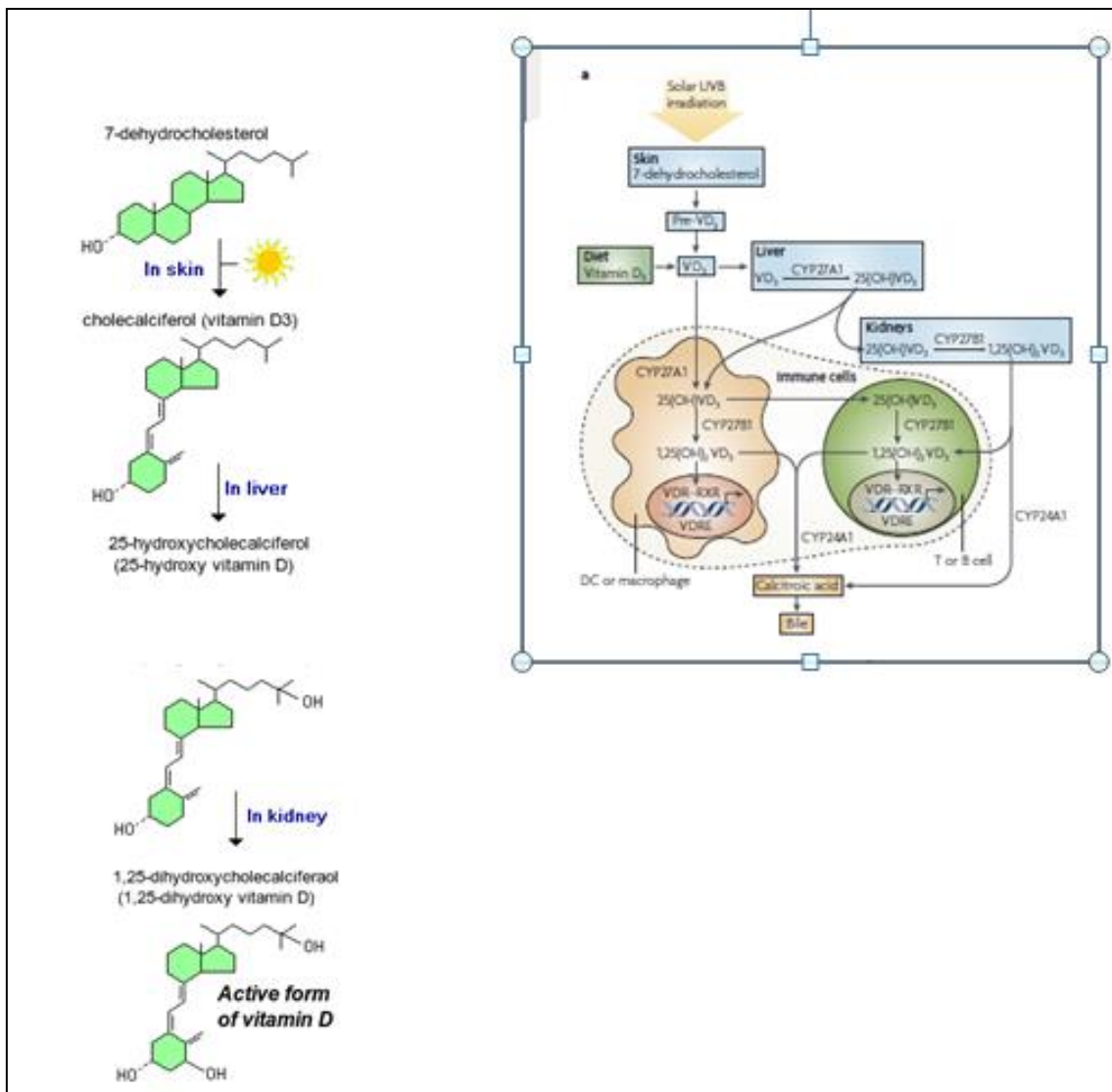


Figura 5. Metabolismo de la vitamina D⁶

Las acciones no clásicas de la vitamina D fueron identificadas hace 30 años, cuando se detectaron receptores para la 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)₂ D₃) en varias líneas celulares⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾. Estudios posteriores demostraron que la unión de la vitamina a estos receptores promovía respuestas antiproliferativas y pro diferenciación en células cancerosas^(203,204). Dentro del espectro de los efectos no clásicos de la vitamina D, se incluyen acciones sobre células del sistema inmune^(205,206). En pacientes con enfermedad granulomatosa como la sarcoidosis, se objetivan niveles elevados de 1,25(OH)₂ vitamina D3 e hipercalcemia asociada. Se observa además un

⁶ Tomado de la siguiente publicación: Mora JR, Iwata M, Ulrich H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. Nature Reviews 2008 8: 685-698

aumento de la enzima 25-hidroxivitamina D-1- α -hidroxilasa (1 α hidroxilasa). Al contrario que en sujetos normales en los que la actividad de esta enzima está localizada en el riñón, en pacientes con sarcoidosis se observa actividad de la misma en macrófagos asociados a la enfermedad⁽²⁰⁷⁻²¹⁰⁾. La desregulación de la 1,25 (OH)₂ D₃ no está restringida a la sarcoidosis sino que constituye un rasgo común en muchas enfermedades granulomatosas y en algunas formas de cáncer⁽²¹¹⁾. La naturaleza precisa de la interacción entre la vitamina D y el sistema inmune tardó muchos años en identificarse y existen aún muchas interrogantes sobre dicha interacción.

2.1. Vitamina D y la inmunidad innata.

2.1.1. Macrófagos, vitamina D y catelicidina.

Junto con las células NK y los linfocitos T citotóxicos, los macrófagos y sus precursores monocíticos juegan un papel fundamental en el inicio de respuestas no específicas frente a organismos patogénicos o frente al daño tisular. Este papel consiste en fagocitar patógenos o detritus celulares y después eliminar o asimilar el material.

Durante muchos años se pensó que la acción más importante de la vitamina D sobre los macrófagos era debida a su capacidad para estimular la diferenciación de los precursores monocíticos a macrófagos maduros^(203,205,212,213). Este concepto se apoyó en observaciones que mostraban diferente expresión del receptor de la vitamina D (VDR) y α -1 hidroxilasa en las diversas etapas de diferenciación de los macrófagos. Algunos estudios muestran que los macrófagos humanos son capaces de sintetizar 1,25 (OH)₂ D₃ cuando se los estimula con IFN γ ^(214,215). La confirmación de este efecto sobre los monocitos se obtuvo en 2006 cuando Robert Modlin llevó a cabo análisis con el objeto de definir genes de inmunidad innata específicamente modulados en monocitos por *Mycobacterium tuberculosis*. VDR y el gen que codifica para la 1- α hidroxilasa (CYP27B1) son inducidos a través de la vía del receptor " toll like" 2/1 (TLR 2/1). La interacción de TLR 2/1 con el precursor de la vitamina D (25 OH D₃) estimula la expresión de la proteína antibacteriana catelicidina⁽²¹⁶⁾. La regulación de la transcripción de la catelicidina mediante la unión de VDR a 25 (OH)D₃ es posible porque su

gen promotor contiene un elemento funcional de respuesta a la vitamina D3 (VDRE). Este elemento sólo está presente en los primates más desarrollados, lo que es sugestivo de que la regulación de la vitamina D en esta faceta de la inmunidad innata es un evento reciente del desarrollo evolutivo^(217,218). El mecanismo preciso por el cual la activación TLR induce la expresión de VDR y de 1- α hidroxilasa no está aclarado. El análisis de los eventos involucrados en la regulación transcripcional de CYP27 B1 sugiere que la interacción con TLR involucra a la vía JAK/STAT, a las quinasas MAP y al factor nuclear Kappa beta (NF- κ β) y que todo ello se produce de forma sinérgica con la inducción de CYP27B1 por IFN γ . Otros estudios proponen que la inducción de CYP27B1 por TLR2/1 se produce indirectamente a través de la IL-15 e IL17A. La enzima 24-hidroxilasa, cuya función es inactivar a la 1,25 (OH) $_2$ D3, es codificada por un gen (CYP24) que es inducido por 25 OH D3 tras su activación por TLR2/1 en los monocitos^(219,220).

La regulación de la proteína antibacteriana catelicidina por 1,25 (OH) D3 se describe en una gran variedad de tipos celulares además de en los monocitos: queratinocitos, células epiteliales pulmonares, células mieloides y células del trofoblasto placentario⁽²²¹⁾. Sin embargo, los mecanismos que controlan la síntesis local de 1,25 (OH) $_2$ D3 varían considerablemente. Aunque la mayoría de los estudios sobre la inmunidad innata mediada por vitamina D se centran en el papel de VDR unido a 1,25 (OH) $_2$ D3 como regulador pivotal transcripcional de catelicidina, es importante saber que otros ligandos pueden interactuar con VDR, como sucede en las células epiteliales biliares en las que la proteína antibacteriana es inducida por VDR a través de las sales biliares. Dado que esto proporciona estabilidad a las sales biliares, se ha propuesto esta aplicación de la vitamina D para el tratamiento de la cirrosis biliar primaria^(222,223).

Parece demostrado que la vitamina D es un potente estimulador de los mecanismos asociados con la eliminación de patógenos y que la aparición de este sistema en primates (incluyendo el Homo sapiens temprano), expuestos a abundante cantidad de luz solar, constituyó una ventaja evolutiva . De hecho, se trata de un sistema que dispone de mecanismos claves de control ; no sólo dispone de una enzima catabólica , la 24-hidroxilasa, que atenúa las

respuestas a 1,25 (OH)₂ D₃, sino que presenta mecanismos de retroalimentación. 1,25 (OH)₂ D₃ se muestra como un potente regulador a la baja de TLR2 y TLR4 en monocitos, suprimiendo las respuestas inflamatorias que son activadas por estos receptores. De ahí que, utilizando CYP24 y los mecanismos regulatorios TLR, la vitamina D ayuda a promover respuestas inmunes innatas previniendo el daño tisular asociado a una inflamación excesiva^(224,225) (figura 6).

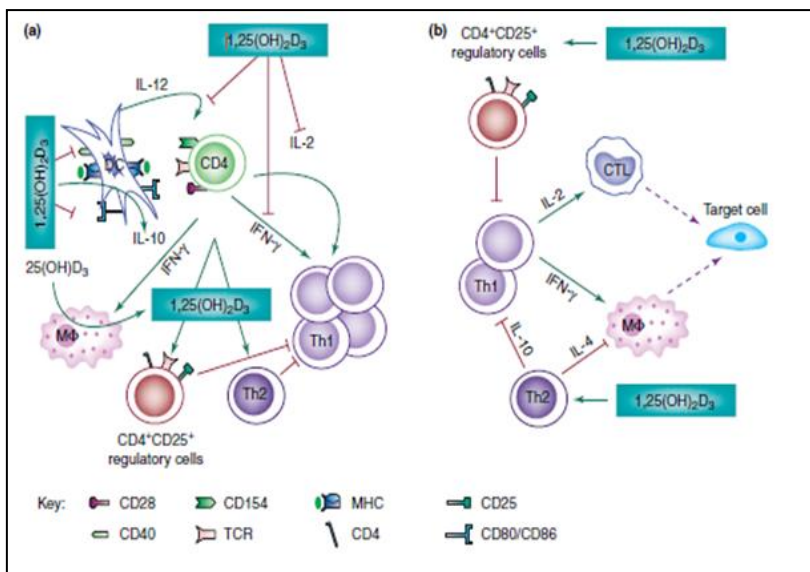


Figura 6. Regulación de la respuesta inmune por la vitamina D⁷.

2.1.2. Células dendríticas y presentación antigénica.

La inmunidad innata es responsable de la presentación de antígenos resultantes de la eliminación de patógenos y de restos tisulares a las células pertenecientes a la inmunidad adaptativa. Aunque existen varios tipos tisulares que pueden desempeñar esta misión, las más reconocidas de las células profesionales presentadoras de antígenos son las células dendríticas. La expresión de VDR en células purificadas dendríticas fue comunicada por primera vez en 1987⁽²²⁶⁾. Estudios realizados posteriormente purificando células dendríticas de la piel (células de Langerhans) evidenciaron que la 1,25 (OH)₂ D₃ podía atenuar el efecto de la presentación antigénica⁽²²⁷⁾. Sin embargo, el

⁷ Tomado de la siguiente publicación: Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25 dihydroxivitamin D analogs as immunomodulatory agents. TRENDS in Molecular Medicine 2002: 1-6.

papel de la vitamina D y sus metabolitos no fue dilucidado hasta el advenimiento de los modelos de células dendríticas derivadas de monocitos. En el año 2000, estudios paralelos de los grupos de Adovini y Kunner mostraron que la 1,25 (OH)₂ D₃ y sus análogos sintéticos inhibían la maduración de las células dendríticas derivada de monocitos, suprimiendo su capacidad para presentar antígenos a las células T^(228,229). Con base en estas observaciones, se propuso que la vitamina D podría promover la tolerancia y esto fue estudiado en modelos de trasplante de islotes pancreáticos en los que se observó menor tasa de rechazo en ratones tratados con vitamina D⁽²³⁰⁾. Esta respuesta parece ser debida a una maduración disminuida y a la afectación concomitante de los linfocitos T supresores o de las células T reguladoras⁽²³¹⁾. Otros datos indican que las células dendríticas expresan 1-alfa hidroxilasa de forma similar a los macrófagos⁽²³²⁾. La expresión de 1- α hidroxilasa y su actividad se incrementa conforme se produce la diferenciación de la célula dendrítica hacia un fenotipo maduro⁽²³³⁾. El tratamiento con 25 (OH) D₃ suprime la maduración de las células dendríticas e inhibe la proliferación T, confirmando la existencia de una vía intracrina para la vitamina D similar a la observada en macrófagos. Las células dendríticas maduras muestran bajos niveles de VDR en relación con las células dendríticas inmaduras o con los monocitos. Sin embargo, sintetizan elevados niveles de vitamina D que actuaría sobre las células dendríticas inmaduras, con alta expresión de VDR, previniendo su futuro desarrollo. De este modo, la expresión de VDR y la acción paracrina de la vitamina D permitiría por un lado una inicial presentación antigénica y respuesta de los linfocitos T y, por otro lado, el bloqueo madurativo de las células dendríticas, impediría la sobreestimulación de los linfocitos T⁽²³⁴⁾.

Las células dendríticas mieloides son las presentadoras de antígenos más eficaces y las células dendríticas plasmacitoides son las más relacionadas con la tolerancia antigénica. La 1,25 (OH)₂ D₃ regula preferentemente las células dendríticas mieloides, con lo que parece que el efecto más importante de la vitamina D es suprimir la activación de células T. Aunque los estudios sugieren una aparente insensibilidad de las células dendríticas plasmacitoides a la 1,25 (OH)₂ D₃, es posible que la síntesis local

de vitamina D por estas células podría participar en el mecanismo de tolerancia al actuar sobre el receptor VDR expresado en células T^(235,236).

2.2-Vitamina D e inmunidad adaptativa.

Las poblaciones T y B pueden ser divididas en subpoblaciones proinflamatorias, tales como los linfocitos T "helper"(Th)1 y Th17, o en subpoblaciones antiinflamatorias, tales como los TH2 y las células B reguladoras.

2.2.1. Vitamina D y linfocitos T.

Las células T no activadas expresan niveles indetectables de VDR, pero la expresión del receptor se incrementa cuando la célula T prolifera tras la activación antigénica. La 1,25(OH)₂ D₃ inhibe preferentemente las células T "helper", un subtipo de linfocito T efector estrechamente asociado con respuesta inmune celular⁽²⁴⁰⁾. Varios estudios posteriores confirmaron esta observación y demostraron que el perfil de citoquinas de las células T humanas tratadas con 1,25 (OH)₂ D₃ las identifica como células Th2, un subtipo de linfocitos T asociado a inmunidad mediada por autoanticuerpos^(241,242). La conclusión de estas observaciones es que la vitamina D podría limitar el potencial daño tisular asociado a las respuestas inmunes Th1. Sin embargo, la validez de esta generalización fue cuestionada en modelos de ratón en los cuales la vitamina D era capaz de inhibir las citoquinas asociadas a Th1 (INF gamma) y a Th2 (IL-4)⁽²⁴³⁾. Se ha observado en modelos animales en los que las células inmunes no expresan VDR que existe una población muy reducida Th1. A lo largo de los años, el repertorio de las células T se ha ido incrementando con la caracterización de otro linaje celular diferente a Th1 y Th2, las células Th17, que segregan IL-17 y que tienen un papel esencial para combatir ciertos patógenos, participando además en mecanismos de daño tisular y de inflamación^(244,245). El papel de la vitamina D como reguladora de esta población no está bien delimitado pero es interesante señalar que en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal el tratamiento con vitamina D reduce la expresión de IL-17, mientras que la alteración genética que lleva a la pérdida de CYP27B1 y, por tanto, a la producción de 1,25(OH)₂ D₃ produce la elevación de esta citoquina^(246,247). De ahí que sea posible que la

vitamina D ejerza sus efectos sobre la inflamación y la enfermedad autoinmune a través de la regulación de las células Th17. Un cuarto grupo de células T CD4 ejerce funciones más supresoras que efectoras y se conocen como células T reguladoras. Teniendo en cuenta su papel supresor de la proliferación T, se sugirió que la vitamina D podría tener efecto sobre ellas y , en 2002, se demostró que la 1,25 (OH)₂ D₃, en conjunción con los esteroides, estimulaba la producción de IL-10 por las células T reguladoras CD4+CD25^(248,249). Otros estudios indicaban que la vitamina D producía una diferenciación preferencial T reguladora en relación con la inducción de células dendríticas tolerogénicas^(250,239). Sin embargo, parece probado que la vitamina D incrementa la secreción de IL-10 y de TLR9 por las células T reguladoras, con lo que de algún modo constituye un sistema que une las respuestas inmunes y adaptativas⁽²⁵¹⁾.

Por el contrario, las células T CD8+ muestran una pobre respuesta a la 1,25 (OH)₂ D₃^(238,252-254). A pesar de la importante expresión de VDR que presentan , la 1,25 (OH)₂ D₃ no parece tener un impacto significativo en modelos animales como la encefalomiелitis experimental autoinmune en los que están implicadas las células T CD8^(255,256).

Además de su efecto sobre determinadas poblaciones T, estudios recientes muestran que la vitamina D puede ejercer también un efecto sobre el fenómeno de "homing" o tropismo de las células T por tejidos específicos⁽²⁵⁷⁾. Parece que la vitamina D inhibe la migración de las células T a ganglios linfáticos. Es posible que tenga también un papel activo en la afluencia de linfocitos T a la piel regulando al alza el receptor 10 de citoquinas (CCR10), cuyo ligando CCL27 es expresado por queratinocitos epidérmicos. Esta acción sobre el fenómeno "homing" se produce tanto por la 25 (OH) D₃ como por la 1,25 (OH)₂ D₃ y los autores sugieren que tanto las células dendríticas como los linfocitos T son la fuente de actividad 1 alfa hidroxilasa⁽²⁵⁸⁾. Sin embargo, la vitamina D parece ejercer un efecto negativo sobre las citoquinas y sus receptores en el tracto gastrointestinal. Parece que esta acción es altamente selectiva sobre las células T ya que estudios más recientes sobre ratones carentes del gen VDR han demostrado una migración aberrante de células T CD8, lo que parece aumentar el riesgo de colitis en estos ratones⁽²⁵⁹⁾.

2.2.2. Vitamina D y linfocitos B.

Además de la función clásica de los linfocitos B como precursores de células plasmáticas productoras de anticuerpos y, por tanto, como subtipo celular sobre el que asienta la inmunidad humoral, se han descrito poblaciones de linfocitos B cuya principal función es la producción de IL-10 y que podrían corresponder a subpoblaciones B reguladoras. Algunos modelos animales de enfermedades autoinmunes han revelado que las células B reguladoras productoras de IL-10 pueden suprimir los procesos inflamatorios. La IL-10 derivada de células B parece importante para la generación y mantenimiento de las células T reguladoras. En modelos en los que se bloquea la maduración de células B, existe una capacidad reducida para la inducción de tolerancia y esta incapacidad está asociada con un potencial inadecuado de generación de células T reguladoras FoxP3+. Estos hallazgos son corroborados por modelos murinos de artritis en los que la deficiencia de IL-10 derivada de células B exacerba la enfermedad y presentan bajos niveles de células T reguladoras, que se restablecen con la transferencia de células B productoras de IL-10⁽²⁶⁰⁻²⁶⁷⁾. Déficits en la función y frecuencia de células B reguladoras se han comunicado en la esclerosis múltiple y en el lupus eritematoso sistémico⁽²⁶⁸⁻²⁷¹⁾.

Al igual que las células T, las células B activas expresan VDR. Tal como se mostró en estudios experimentales, las células B en reposo presentan bajos pero claramente detectables niveles de ARNm para VDR^(272,273). Después de la incubación con anti CD40/IL-21, se observa un incremento en la expresión de VDR. La adición de 1,25 (OH)₂ D₃, duplica la expresión de ARNm para VDR. VDR parece ser funcional en células B activadas, lo que se concluye de la inducción de ARN m para CYP24A1 en presencia de 1,25 (OH)₂ D₃⁽²⁷¹⁾. Estos datos indican que el mecanismo de retroalimentación negativo es operacional en células B, dado que el ARNm para CYP24A1 no es detectable en células B en reposo. La adición al sobrenadante de cultivos celulares de células B activadas durante 48 horas genera la producción de 1,25 (OH)₂ D₃, debido a la presencia de CYP27B1 en el sobrenadante⁽²⁷⁴⁾. Las células B activadas son, por tanto, capaces de metabolizar la vitamina D y responder a su componente activo. Los estudios iniciales indicaban que la 1,25 (OH)₂ D₃ podría regular la producción de células B y la secreción de inmunoglobulinas, de forma indirecta

o de forma directa. La vitamina D podría actuar directamente sobre las células plasmáticas, aunque se conoce poco sobre la expresión de VDR en estas células. Estudios sobre perfiles de expresión génica en células plasmáticas circulantes en pacientes con LES revelan que VDR está regulado al alza en relación con las células B vírgenes memoria⁽²⁷⁵⁾. La vitamina D parece interferir directamente en la generación de células plasmáticas, pero es menos probable su efecto sobre la inducción de la apoptosis de células plasmáticas o sobre la inhibición de la secreción de inmunoglobulinas. Estudios en los que se cultiva célula B purificadas en presencia de vitamina D evidencian un descenso en el porcentaje y en el número absoluto de células plasmáticas así como en los niveles de IgA, IgG e IgM, siendo los resultados contradictorios con IgE⁽²⁷⁶⁻²⁸¹⁾. La formación de linfocitos B memoria también se ve inhibida por la 1,25 (OH)₂ D₃. Por tanto, los resultados de la vitamina D sobre las células B podrían resumirse como disminución del "pool" de células B memoria e inhibición de la generación de células plasmáticas, con el consecuente descenso en la secreción de anticuerpos. Sobre células B vírgenes, que constitutivamente expresan VDR y CYP27B1, la respuesta a la vitamina D consiste en incremento en la expresión de VDR, de 25 (OH) D₃ y de la enzima degradante de 1,25 (OH)₂ D₃ CYP24A1. Después de la activación, mejora la expresión de VDR y CYP27B1, lo que incrementa el nivel de 1,25 (OH)₂ D₃ y estimula el mecanismo de retroalimentación negativo a través del aumento de CYP24A1⁽²⁷²⁾. La participación de las células B reguladoras en la homeostasis inmune ejercida por la vitamina D parece confirmarse en modelos murinos de enfermedades autoinmunes en los que se requiere una vía funcionante mediada por IL-10 para garantizar el efecto sobre la enfermedad de la 1,25 (OH)₂ D₃^(282,283). Todas estas acciones sobre las células B se refuerzan de forma indirecta a través de su efecto sobre los linfocitos T "helper".

2.3. Huella genética de la vitamina D en el sistema inmune.

El análisis profundo genómico ha permitido definir una nueva perspectiva sobre la vitamina D y su función en el ser humano. En los macrófagos, la descripción de niveles incrementados de VDR y de 1 α hidroxilasa (CYP27B1) tras un desafío patogénico subrayó la importancia de sistema intracrino de la vitamina D como mediador de la respuesta inmune^(284,285). Se sabe

actualmente que los macrófagos y las células dendríticas son capaces de responder a la 25 (OH) D₃, el mayor metabolito circulante de la vitamina D, lo que proporciona un vínculo entre estas células y la vitamina D en los humanos. La identificación de cientos de genes dianas para la 1,25 (OH)₂ D₃ en células inmunes ha aportado también una nueva perspectiva sobre el papel de la vitamina D en el sistema inmune adaptativo.

El primero de los estudios genómicos centrado en acciones extraesqueléticas de la vitamina D fue publicado por John White y colaboradores en la universidad McGill de Montreal y utilizó una combinación de arrays de DNA sobre genes regulados por la 1,25 (OH)₂ D₃ y estrategias in silico ⁽²⁸⁶⁻²⁹³⁾. El análisis profundo de las secuencias dianas que son capaces de ligar a VDR revela elementos de respuesta (VDRE) que se localizan junto a genes promotores de proteínas antibacterianas como la catelicidina (CAMP) y la beta defensina 2 (DEFB4). Sólo CAMP parece ser inducida transcripcionalmente en monocitos ⁽²⁹⁴⁾. El mecanismo subyacente para la regulación diferencial de CAMP y DEFB4 por la 1,25 (OH)₂ D₃ fue determinado en estudios posteriores. El primero de ellos describía la expresión incrementada en monocitos de DEFB4 tras tratamiento con 1,25 (OH)₂D₃ e IL-1. Se requería para ello la ocupación cooperativa de VDRE por el NF-κβ y por otro lado la unión de VDRE con el gen promotor de DEFB4⁽²⁹⁴⁾. La importancia de NF-κβ y de VDR como coinductores de la transcripción de DEFB4 fue reforzada posteriormente en estudios sobre la proteína NOD2 de los patógenos intracelulares, inducida transcripcionalmente por la 1,25 (OH)₂ D₃⁽²⁹⁵⁾. Las células tratadas con 1,25 (OH)₂ D₃ y con el ligando de NOD, MDR, un producto de la pared de los microorganismos Gram+ y Gram-, muestran una potente inducción de DEFB4 dependiente de NF-Kbeta ^(296,297). Sin embargo, la inducción de CAMP es primariamente dependiente de la unión de VDR al promotor VDRE. El elemento VDRE inicialmente identificado como el promotor de CAMP parece ser específico de los primates humanos y subhumanos⁽²⁹⁸⁾. La adquisición de un elemento VDRE para el gen CAMP parece haber ocurrido por la introducción de un elemento nuclear (SINE) que puso a CAMP bajo el control del receptor VDR. Esta adaptación específica de los primates se ha conservado en humanos y en primates del Viejo y del Nuevo Mundo, sugiriendo

que el mecanismo transcripcional regulatorio de CAMP por la vitamina D confiere ventajas biológicas. Se asume que este mecanismo podría estar potentemente activado por los relativamente elevados niveles de 25 (OH)D3 y de 1,25 (OH)₂ D3 que son característicos de los primates no humanos. En el hombre moderno, en el que el status de vitamina D es más variable, el mecanismo antibacteriano podría ser menos efectivo. Puesto que hay un mecanismo hipotético que apoya el beneficio de la suplementación con vitamina D en la inmunidad innata, la cuestión más importante radica en qué variación de los niveles de 25 (OH)D3 es capaz de producir una respuesta inmune conducida por su metabolito activo 1,25 (OH)₂D3 y VDR. Para las células, el reconocimiento y la respuesta a los patógenos implica la identificación de patrones moleculares asociados a vigilancia de patógenos (PAMPs) mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Entre estos receptores se encuentra la extensa familia de los receptores "Toll like" (TLR), proteínas transmembrana no catalíticas que interaccionan con específicos PAMPs⁽²⁹⁹⁾. Muchos genes de macrófagos podrían estar regulados diferencialmente por una lipoproteína de 19 Kd tipo PAMP que interacciona con TLR1/2. En estudios genómicos sobre modelos de infección tuberculosa, el estímulo TLR2/1 a través de esta lipoproteína induce la expresión de CY27B1 y VDR, sugiriendo que en la respuesta macrofágica a *Mycobacterium tuberculosis* está implicado el sistema endógeno intracrino de la vitamina D. Los macrófagos tratados con el ligando TLR1/2 son reactivos a las formas 1,25 (OH)₂ D3 y 25(OH) D3 de la vitamina D, confirmando la eficacia funcional del modelo intracrino. La inhibición de la actividad 1 α hidroxilasa bloquea la acción de la 25 (OH) D3, subrayando la importancia del metabolismo celular específico como determinante de la inmunorregulación de la vitamina D⁽³⁰⁰⁾. La estimulación de TLR1/2 por *Mycobacterium tuberculosis* produce además la inducción de la enzima catabólica de la vitamina D (CYP24A1) y de la proteína antibacteriana CAMP. La expresión de la otra proteína antibacteriana DEFB4 es resultado de la acción cooperativa entre la vía TLR1/2, Il-1, la vía NOD2 MDP. Las proteínas antibacterianas tales como CAMP y DEFB4 juegan un papel crucial en la muerte intracelular bacteriana mediada por vitamina D. Los monocitos tratados con concentraciones crecientes del peptido CAMP muestran una reducción dosis dependiente de la internalización de

Mycobacterium tuberculosis y una inhibición similar en macrófagos sucede en presencia de 25 OH D3, siendo este efecto interrumpido por los antagonistas de VDR⁽²⁹⁶⁾. La vitamina D y sus análogos son capaces de promover autofagia, siendo muy importante esta inducción para provocar respuestas antibacterianas a través de la vitamina D en la infección tuberculosa. La síntesis intracrina de 1,25 (OH)₂ D3 parece regular la expresión de otra proteína antibacteriana, la hepcidina (HAMP)^(301,302). La mayor función atribuida a HAMP parece ser la supresión de la proteína de membrana ferroportina, la única exportadora de hierro intracelular. Este vínculo en células como los enterocitos, hepatocitos y monocitos juega un papel clave en la denominada anemia de proceso crónico⁽³⁰¹⁾. Dado que los patógenos como las bacterias utilizan el hierro para mantener el crecimiento, la restricción del hierro de la circulación proporciona una respuesta importante del huésped a la infección sistémica⁽³⁰³⁾. Sin embargo, para patógenos tales como *Mycobacterium tuberculosis* que evaden la vigilancia inmunológica a nivel intracelular, la acumulación de hierro en este entorno puede promover el crecimiento de patógenos intracelulares. La vitamina D en sus formas 25 OH D3 y 1,25 (OH)₂ D3 suprime la transcripción de HAMP en monocitos y hepatocitos, lo que lleva a la liberación del bloqueo a la ferroportina dependiente de HAMP, favoreciendo el transporte del hierro y disminuyendo la concentración del mismo a nivel intracelular⁽³⁰³⁾.

La vitamina D ejerce también un efecto regulador sobre los monocitos disminuyendo la expresión de TLR2 y TLR 4 en los mismos, lo que promueve mecanismos de control que limitan la actividad antibacteriana y otras respuestas inmunes. De este modo se previene la sobreelaboración de la respuesta inmune⁽³⁰³⁾. La inducción por VDR en monocitos de CAMP y DEFB4 así como la supresión de HAMP parecen específicas de primates⁽³⁰⁴⁾.

Los neutrófilos expresan VDR pero, al contrario que los monocitos y macrófagos, no parecen expresar una enzima 1 α hidroxilasa funcional y no están sujetos a una activación intracrina del sistema de la vitamina D.

Las células dendríticas, que pertenecen al mismo linaje hematopoyético de los monocitos y de los macrófagos, expresan VDR y CYP27B1 y exhiben un

sistema activo intracrino de vitamina D⁽³⁰⁵⁻³⁰⁷⁾. Tal como se ha comentado anteriormente, las células dendríticas utilizan un sistema paracrino de vitamina D, en el que la diferenciación hacia célula presentadora de antígeno implica incremento de CYP27 B1 y paradójicamente disminución en la expresión de VDR⁽³⁰⁸⁾. Por tanto, las células inmaduras expresan VDR y responden a la 1,25 (OH)₂ D₃ producida por células maduras, con baja expresión de VDR. Tal mecanismo persigue la maduración de la célula dendrítica y la promoción de la activación T y previene la sobreelaboración de la respuesta inmune. Además, la vitamina D ejerce un efecto diferencial según se trate de una célula dendrítica mielóide, derivada de monocitos o plasmacitoide. Las primeras son promotoras de la función de las células T vírgenes⁽³⁰⁹⁾ mientras que las plasmacitoides están más relacionadas con la atenuación de la función de las células T⁽³¹⁰⁾. Todas ellas expresan niveles similares de VDR. In vitro, la 1,25 (OH)₂ D₃ regula preferencialmente la función de las células dendríticas mieloides, suprimiendo la activación de las células T vírgenes. La vitamina D generada por las células dendríticas plasmacitoides no interviene en su maduración pero actúa de forma paracrina sobre células T que expresan VDR⁽³¹¹⁾. El efecto dominante en células dendríticas derivadas de monocitos es la inducción de proteínas del citoesqueleto de forma similar a lo observado con los glucocorticoides y activación de vías metabólicas tales como la de del catabolismo de los carbohidratos y neoglucogénesis⁽³¹²⁾.

En cuanto a la inmunidad adaptativa, las observaciones iniciales que relacionaban a la vitamina D con el sistema inmune demostraron la presencia de VDR en linfocitos activados. El desarrollo linfocitario tiene lugar en el timo con la expresión de VDR en timocitos medulares⁽³¹³⁾. Sin embargo, una vez que las células abandonan el timo y se incorporan a la circulación como células T, la expresión de VDR se pierde hasta que estas células son activadas y proliferan por mitógenos^(314,315). La 1,25 (OH)₂ D₃ es un inhibidor potente de la proliferación T, bloqueando la transición en el ciclo celular de la fase temprana G1 a la fase tardía. Se ha observado que la expresión de VDR y la capacidad de respuesta a la 1,25 (OH)₂ D₃ son proporcionales a la tasa de proliferación celular⁽³¹⁶⁾. Como se ha mencionado anteriormente, el efecto predominante de

la vitamina D sobre la función inmune adaptativa consiste en la modulación del fenotipo T "helper".⁽³¹⁷⁻³²¹⁾

La vitamina D también puede actuar sobre células T CD8 citotóxicas que expresan niveles elevados de VDR^(322,323). En ratones, las células CD8 expresan la enzima activadora de vitamina D, 1- α -hidroxilasa⁽³²⁴⁾. Sin embargo, en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos CD8, la vitamina D no parece representar algún papel. Recientes estudios han mostrado un vínculo entre la vitamina D y una variante de las células T CD8, las células CD8 alfa alfa, que no son citotóxicas y juegan un papel en la supresión de la inflamación gastrointestinal⁽³²⁵⁾. Los ratones que no expresan VDR exhiben bajos niveles de CD8 $\alpha\alpha$, debido a la expresión descendida del receptor de quimoquinas CCR9, previniendo el aflujo de células T al tracto gastrointestinal. Ya se ha mencionado el efecto sobre el fenómeno "homing" de células T⁽³²⁶⁾. Los metabolitos de la vitamina D influyen en el "fenómeno homing" T en otros tejidos. En la piel, la 1,25 (OH)₂ D3 estimula la expresión del receptor de quimoquina 10 (CCR10), que reconoce la quimoquina CCL27 secretada por los queratinocitos⁽³²⁷⁾. Además de actuar como moduladora del fenotipo Th y su función, la vitamina D puede actuar sobre la inmunidad adaptativa promoviendo a las células T supresoras conocidas como células T reguladoras^(328,329). Se ha descrito también un efecto directo de la 1,25 (OH)₂ D3 mediante la generación de CTLA4 en células T reguladoras⁽³³⁰⁾. En algunos estudios, se señala la importancia en este efecto de la vitamina D sobre la interacción entre células dendríticas y T reguladoras de la proteína de unión DBP, concluyendo que la forma no unida a dicha proteína es la biológicamente activa para la generación de células T reguladoras⁽³³¹⁾.

Como se ha comentado anteriormente, estudios tempranos establecieron que la 1,25 (OH)₂ D3 podría suprimir el desarrollo de las células B productoras de inmunoglobulinas siguiendo el estímulo antigénico⁽³³²⁾. Esto podría ser debido a un mecanismo indirecto a través de la inhibición Th o a través de un efecto directo de supresión de la diferenciación de las células B en dos de sus tipos, las células memoria y las células plasmáticas. Análisis de arrays han

identificado también a VDR como parte de los genes involucrados en la formación de centros germinales B ⁽³³³⁻³³⁸⁾.

2.4. Estatus de la vitamina D y función inmune.

La mayoría de los análisis genómicos profundos que exploran los efectos inmunomoduladores de la vitamina D in vitro se han focalizado en los tratamientos que utilizan 1,25 (OH)₂ D3 o sus sintéticos análogos. Sin embargo, la inducción por patógenos de un sistema intracrino tal como el de los monocitos/macrófagos sugiere que la regulación in vivo es independiente de la 1,25 (OH)₂ D3 sistémica. Probablemente, este sistema esté conducido inicialmente por la activación local de la 25 (OH) D3, la forma circulante mayoritaria de la vitamina D y determinante del estatus de la vitamina D en cada individuo.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la insuficiencia en vitamina D (niveles séricos inferiores a 30 ng/ml) se asocia con riesgo incrementado de tuberculosis ⁽³³⁹⁻³⁴²⁾. Los ensayos clínicos con suplementos de vitamina D añadidos a la antibioterapia convencional han presentado un éxito variable. Cuando se empleaban 10000 UI diarias de vitamina D, se demostró que las concentraciones séricas de vitamina D ascendían en pacientes tuberculosos, pero no mejoró el tiempo de conversión del esputo frente a los pacientes incluidos en el grupo placebo. Sin embargo, en un subgrupo específico de enfermos con un polimorfismo de un único nucleótido Taq1 en el gen VDR sí se demostró dicha reducción, sugiriendo que factores genéticos pueden influir en la respuesta inmune al suplemento con vitamina D ⁽³⁴³⁾.

El vínculo entre vitamina D e infección no está restringido a pacientes con tuberculosis. En pacientes con sepsis, los niveles circulantes de 25 (OH)₂ D3 se correlacionan con las concentraciones séricas de CAMP e inversamente con enfermedad crítica en estos pacientes ^(344,345). Bajos niveles de 25 (OH)D3 están vinculados a infecciones respiratorias como la gripe y, en pacientes con insuficiencia renal crónica, se correlacionan con un aumento de la tasa de infección y mortalidad ⁽³⁴⁶⁾.

La aplicación de los análisis genómicos profundos para evaluar el impacto del estado sérico de la vitamina D en la función inmune es limitada. Los análisis de arrays de expresión génica en células mononucleares sanguíneas de pacientes con niveles adecuados de vitamina D y con niveles insuficientes revelan diferencias en la expresión de genes. Sin embargo, después del suplemento con vitamina D, no se corrige esta diferencia en la expresión génica, incluso aunque se hayan incrementado los niveles séricos de vitamina D en los pacientes insuficientes ⁽³⁴⁷⁾.

En modelos animales, los análisis profundos de las respuestas inmunes cuando existe un status alterado de la vitamina D presentan también limitaciones⁽³⁴⁸⁾. Los ratones deficientes en vitamina D muestran una expresión disminuida de angiogenina 4, una proteína antibacteriana que actúa minimizando la invasión de los tejidos por bacterias entéricas. Esto conlleva elevados niveles de bacterias en el epitelio del colon y supone un compromiso de la vigilancia inmune innata ⁽³⁴⁹⁾. Esta desregulación de la respuesta a las bacterias entéricas parece presentar un vínculo con el inicio de la inflamación tisular asociada con algunos tipos de enfermedad inflamatoria intestinal. Es posible que la vitamina D juegue un papel en la protección contra esta enfermedad induciendo la proteína antibacteriana angiogenina 4 ⁽³⁵⁰⁾.

Un reciente estudio sobre casi 34000 individuos muestra que los polimorfismos de un único nucleótido en el gen DBP son la clave del condicionamiento genético del status bajo en vitamina D (niveles de 25 (OH) D3 inferiores a 75 mM o 30 ng/ml). Variaciones genéticas en DBP influyen sobre las concentraciones séricas de la proteína DBP, que, a su vez, están ligadas a los niveles séricos totales de 25 (OH) D3 y 1,25 (OH)₂ D3. Las variaciones genéticas de la proteína DBP podrían estar relacionadas con diferentes afinidades de la 25 (OH) D3 con la proteína DBP ⁽³⁵¹⁻³⁵³⁾. La fracción libre no unida a DBP parece ser la forma en que la vitamina D accede a células dianas como los monocitos, presumiblemente mediante difusión pasiva a través de las membranas celulares por su composición lipídica soluble (hipótesis de la "hormona libre"). Las respuesta antibacterianas a 25 (OH) D3 son más acusadas con formas de DBP de baja afinidad que implican niveles elevados libres de 25 (OH) D3 ^(354,355).

2.5. Vitamina D y patología humana.

Clásicamente se ha considerado que la vitamina D podía tener un papel en el tratamiento de pacientes con síntomas de enfermedad ósea, tales como el raquitismo del niño y la osteomalacia en el adulto, con niveles de vitamina D inferiores a 25 nM. Años más tarde se observó que niveles circulantes de vitamina D inferiores a 75 nM se correlacionaban inversamente con los niveles de hormona paratiroidea, con lo que se fijó este nivel de vitamina D para hablar de estado de insuficiencia de vitamina D^(356,357). Cuando hablamos de niveles circulantes de vitamina D, hacemos referencia a la 25(OH)D₃, ya que las concentraciones séricas de 1,25 (OH)₂ D₃ están definidas por los reguladores endocrinos de la enzima activadora de la vitamina D, la 1 α hidroxilasa; de ello se deriva que el estado de vitamina D puede variar significativamente dependiendo de factores económicos, sociales y geográficos⁽³⁵⁸⁾.

2.5.1. Vitamina D e infección.

La confirmación de que la vitamina D inducía respuestas en las que participaba la inmunidad innata a través de la activación de la vía TLR por *Mycobacterium tuberculosis* proporcionó una explicación para la observación del efecto beneficioso de la exposición a la luz ultravioleta en los pacientes tuberculosos. En estudios *in vitro*, el suplemento con una única dosis oral de 2,5 mg mejoraba la capacidad de los macrófagos para combatir la infección por micobacterias⁽³⁵⁹⁾. El beneficio potencial de la vitamina D en el tratamiento de la tuberculosis se testó en un ensayo clínico en el que se suplementaba a los pacientes tuberculosos con 0,25 mg de vitamina D, demostrándose que se reducía el tiempo de conversión del esputo de positivo para la micobacteria a negativo⁽³⁶⁰⁾.

La lepra, como la tuberculosis, es el resultado de una infección por micobacterias y puede subdividirse en dos subtipos: lepra tuberculoide (T-lep) y lepra lepromatosa (L-lep). Los análisis de arrays de ADN definen dos tipos de perfiles genéticos para ambos subtipos: elevada expresión de CYP27B1, CYP24A1 y VDR en T-lep frente a un sistema D intracrino intacto en T-lep, que es capaz de apoyar las respuestas antibacterianas a la vitamina D. En L-lep, caracterizada por un alto nivel de infección macrofágica y peor pronóstico, al

estar el sistema intracrino de la vitamina D alterado, la elevación de la 25 (OH) D3 sérica es menos efectiva para promover la regulación intracrina de las respuestas antibacterianas. Se desconoce por qué se produce esta alteración en pacientes con L-lep⁽³⁶¹⁻³⁶⁴⁾. Una posibilidad es que el perfil de citoquinas de las células T característico de la L-lep (IL4, IL10 e INF α/β) ejerza un efecto perjudicial en la vía TLR1/2-sistema de la vitamina D^(361,362).

No está claro qué efecto, si hay alguno, presentan los patógenos virales tales como la hepatitis C y el VIH sobre las acciones inmunes y adaptativas de la vitamina D en el sistema inmune, aunque la infección por VIH de algunas células parece suprimir la expresión de VDR^(365,366).

Los pacientes con enfermedad renal crónica en estadios finales y sometidos a hemodiálisis presentan alto riesgo de infección y mortalidad asociada. Estos pacientes son deficientes en vitamina D. Notablemente, los niveles circulantes del factor de crecimiento fibroblástico (FGF23), que juega un papel clave en la regulación endocrina de la homeostasis del fosfato, están elevados de forma muy temprana en la enfermedad renal^(367,368). Una de sus acciones es inhibir la producción de 25 (OH)D3 renal a través de la supresión de CYP27B1, siendo este efecto directo sobre los monocitos^(369,370). Además de proporcionar una explicación para el aumento del riesgo de infección en pacientes con enfermedad renal crónica, estos resultados sugieren un vínculo entre el sistema de la vitamina D y su antítesis endocrina.

2.5.2. Vitamina D y enfermedades inmunes

2.5.2.1 Vitamina D y esclerosis múltiple.

Existen varios estudios epidemiológicos en los que se comunica una asociación entre la insuficiencia de vitamina D y la incidencia y/o severidad de la enfermedad autoinmune denominada esclerosis múltiple⁽³⁷¹⁾. Estas observaciones han sido reforzadas por el análisis de modelos animales tales como el de la encefalomiелitis experimental autoinmune del ratón, que mostraba un incremento en la severidad de los síntomas con la restricción de la vitamina D de la dieta. La administración de 1,25 (OH)₂ D3 a los ratones confiere protección a los mismos a través de su efecto sobre la síntesis de citoquinas y

sobre la apoptosis de células inflamatorias. Como hemos mencionado anteriormente, parte de esta acción de la vitamina D es dependiente de la actividad de la IL-10⁽³⁷²⁻³⁷⁵⁾.

2.5.2.2. Vitamina D y diabetes tipo 1.

Los resultados publicados sugieren que existe un vínculo entre el déficit de la vitamina D y otra enfermedad autoinmune, la diabetes mellitus tipo 1, habiéndose comunicado en adolescentes con esta enfermedad bajos niveles de 25 (OH)D3⁽³⁷⁶⁻³⁷⁸⁾. Varios estudios indican que algunos haplotipos VDR confieren protección contra la diabetes y más recientemente se ha comunicado que las variantes genéticas de CYP27b1 afectan a la susceptibilidad de padecer diabetes tipo 1^(379,380). En modelos de ratón de diabetes tipo 1, se ha evidenciado una mayor severidad de la enfermedad en condiciones de restricción de vitamina D⁽³⁸¹⁾.

2.5.2.3. Vitamina D y enfermedad de Crohn.

Las respuestas inmunes desreguladas observadas en enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn parecen estar ligadas a la vitamina D. Los pacientes con enfermedad de Crohn presentan niveles descendidos de 25 (OH) D3⁽³⁸²⁻³⁸⁴⁾. En varios modelos animales se ha demostrado que la 1,25 (OH)2 D3 juega un papel fundamental en la fisiopatología de formas inducidas de enfermedad inflamatoria⁽³⁸⁵⁻³⁸⁷⁾. La expresión de 1 alfa hidroxilasa ha sido detectada en el colon humano, encontrándose la enzima activadora de vitamina D regulada al alza y su expresión asociada a niveles elevados de 1,25 (OH)2 D3 en pacientes con enfermedad de Crohn, indicando que, como en casos de sarcoidosis, la síntesis localizada del metabolito de la vitamina D puede pasar a la circulación en casos de enfermedad persistente⁽³⁸⁸⁾. Los estudios actuales tienden a considerar que en la iniciación del mecanismo inmune iniciador de la enfermedad de Chron se implican respuestas inmunes aberrantes contra la microbiota entérica, en las que podría influir la vitamina D con su efecto sobre la inmunidad innata y sobre la inmunidad adaptativa⁽³⁸⁹⁾.

2.5.3 Vitamina D en hemopatías malignas.

Experimentos en los que se tratan líneas celulares de células madres hematopoyéticas y líneas celulares leucémicas con la forma activa de la vitamina D demuestran un incremento en la diferenciación monocito/macrófago y un aumento en el número de células maduras que no se evidencia en ratones que carecen de VDR ⁽³⁹⁰⁻³⁹²⁾. Después de su unión al análogo de la vitamina D, VDR forma un homodímero o se une al receptor X de los retinoides (RXR), que procede a interactuar con VDRE originando una señal de transcripción sobre varios ARNs efectores ^(393,391). El receptor del ácido retinoico (RAR) es un compañero de dimerización alternativo para RXR ⁽³⁹⁴⁾. Así como la actividad de VDR conduce a la diferenciación monocítica, la actividad RAR lleva a la diferenciación de granulocitos maduros ⁽³⁹¹⁾. Experimentos con cultivos celulares sugieren que RAR activado y VDR compiten por su unión con RXR y el equilibrio relativo entre los dímeros RAR/RXR y VDR/RXR influye en la relativa actividad de la granulopoyesis o la monopoyesis ⁽³⁹⁵⁾. En modelos animales, la carencia de VDR y RAR permite generar apropiadas unidades formadoras de colonias de monocitos y granulocitos con lo que se sospecha que el efecto primario de la vitamina D se produce sobre la señalización de citoquinas y sobre las etapas finales de diferenciación de estos dos tipos celulares. La complejidad de la interacción entre VDR y RXR ha quedado reflejada en recientes observaciones en las que se demuestra que el ácido retinoico y la vitamina D pueden potenciar su acción mutuamente, de forma que la estimulación de VDR parece incrementarse en presencia de la unión RAR-RXR ⁽³⁹¹⁾.

2.5.3.1. Vitamina D como terapia de diferenciación en patología mieloide.

Debido al efecto anteriormente mencionado sobre la maduración, se ha utilizado la vitamina D y sus análogos como tratamiento en neoplasias mieloides, particularmente síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias agudas mieloblásticas (LAM). Experiencias preclínicas específicas con HL-60 y otras líneas leucémicas, tales como U-937 y THP-1, han mostrado diferenciación y apoptosis de blastos con vitamina D, lo que sugiere que estos componentes, como el ATRA en la LPA, revierten el bloqueo de la diferenciación de los mieloblastos ^(391,396,397). El mecanismo exacto por el que se produce este efecto a través de la activación del receptor de la vitamina D

no está del todo aclarado y las investigaciones han revelado complejas señales cruzadas que implican a la quinasa P13, a la activación de múltiples escalones de diferenciación en la vía MAPK y probablemente a la regulación al alza de factores como p53 ⁽³⁹⁶⁾. Ensayos preclínicos tempranos utilizando dosis suprafisiológicas que inducían diferenciación reflejaron la posibilidad de producir con las mismas hipercalcemia ^(391,398). Sin embargo, otros trabajos demostraron que el fraccionamiento de la dosis podría conseguir el mismo efecto sobre la diferenciación, manteniéndose el nivel de la vitamina D en rango fisiológico ⁽³⁹⁹⁾.

Existen varios estudios en los que se ha empleado la terapia con vitamina D como único agente en SMDs. El primer estudio se efectuó por Koeffler y colaboradores en 1985, comunicando 18 pacientes tratados con 1,25 (OH)₂ D3 con una dosis superior a 2 microgramos al día. Aunque 18 pacientes presentaron respuestas hematológicas menores, la respuesta no persistía más de 12 semanas y la hipercalcemia fue una toxicidad común del tratamiento. Además, al tratarse los pacientes de una población con SMDs de alto riesgo, siete individuos desarrollaron una LAM durante el periodo de estudio ⁽³⁹⁸⁾. Takahashi y colaboradores trataron 11 pacientes con SMD con 1,25 (OH)₂ D3 con resultados similares, aunque fueron capaces de reducir la hipercalcemia asociada con dosificación intermitente ⁽⁴⁰⁰⁾. Otros estudios con análogos de la vitamina D, con una administración de 2000-4000 UI diariamente en pacientes con SMD no consiguieron demostrar respuestas hematológicas aunque la tolerancia fue adecuada ⁽⁴⁰¹⁾. Recientemente, Motomura y colaboradores aleatorizaron una serie de 30 pacientes a recibir 25 (OH) D3 frente a tratamiento de soporte, con un porcentaje similar en ambos grupos de pacientes de bajo y alto riesgo. sólo uno de los 15 pacientes del grupo de la vitamina D progresó a LAM frente a siete del grupo control ⁽⁴⁰²⁾. Existen varios intentos de combinación de la vitamina D con otros agentes citotóxicos y de diferenciación. Siitonen y colaboradores comunicaron una serie de 19 pacientes con todos los tipos y categorías de riesgo de SMDs tratados con una combinación de ácido 13-cis retinoico, 1,25 dihidroxicolecalciferol (un microgramo al día) y ácido valproico, utilizado como inhibidor de la histona deacetilasa ⁽⁴⁰³⁾. Tres pacientes obtuvieron una respuesta hematológica menor,

pero se registró intolerancia en ocho pacientes debido al ácido 13-cis retinoico y al ácido valproico. Una vía prometedora consiste en la utilización de factores de crecimiento con agentes prodiferenciación. En el año 2008 se realizó un estudio con 63 pacientes con SMDs que excluía a los pacientes de alto riesgo con una combinación de eritropoyetina, ácido 13-cis retinoico, 1,25 (OH)₂ D3 y tioguanina si existían blastos presentes. Se obtuvo una respuesta eritroide global del 60%, siendo del 93% en pacientes de bajo riesgo⁽⁴⁰⁴⁾. Posteriormente se combinaron los análogos de la vitamina D con quimioterapia citotóxica en una serie de 53 pacientes con SMD en los que se añadió 13-cis retinoico (20-40 mg al día) a 1,25 (OH)₂D3 (1-1,5 micg al día) con o sin tioguanina. La tasa de respuesta global fue del 60% pero la tasa de respuestas completas fue baja. El 50% de los pacientes consiguió independencia transfusional⁽⁴⁰⁵⁾.

El único estudio que empleó vitamina D en monoterapia en LAM fue realizado en los años ochenta sobre 5 pacientes, cuatro de los cuales presentaron una reducción transitoria en el número de blastos y sólo en uno se describió una breve normalización del estudio medular⁽⁴⁰⁰⁾. Existen dos series de pacientes ancianos con LAM tratados con citarabina a bajas dosis, vitamina D y otro agente. Slapak y colaboradores comunicaron en 1992 el uso de citarabina en infusión continua durante 21 días (20 mg/m²/ día), hidroxiurea (500 mg dos veces al día) y 1,25 (OH)₂ D3 (0,5 micg dos veces al día)⁽⁴⁰⁶⁾. Se obtuvo una tasa de respuesta global del 79%, con un 45% de respuesta completa. La toxicidad fue primariamente hematológica consistiendo en neutropenia y trombopenia, sólo dos pacientes desarrollaron hipercalcemia asintomática que no requirió tratamiento. La media de duración de la remisión fue de 9,8 meses. Estos resultados se consideraron al menos no inferiores a los conseguidos con citarabina como único agente. Ferrero y colaboradores realizaron otro estudio en el año 2008 con una población similar de 30 pacientes (24 LAM, 6 SMD) en los que emplearon citarabina subcutánea (8 mg/m² dos veces al día), 1,25 (OH)₂ D3 (1 micg al día), ácido 13-cis retinoico (20-40 mg al día) y tioguanina (40 mg al día). La mediana de supervivencia fue de 7,5 meses, siendo de 16 meses para los respondedores. La toxicidad se relacionó fundamentalmente con las citopenias⁽⁴⁰⁷⁾. El único estudio publicado en la literatura en el que se compara el tratamiento combinado con análogos de

la vitamina D (1,25 dihidroxicolecalciferol 1 micg al día) y quimioterapia (citarabina 15 mg/m²/ día por vía subcutánea hasta que los blastos fueron inferiores al 50%) frente a un grupo control fue realizado en Suecia sobre un total de 78 pacientes, 68 con SMD y 15 con LAM. La mitad de los pacientes recibió además ácido 13-cis retinoico (1 mg/Kg/día). La media de supervivencia fue de 10,5 meses, sin diferencia significativa entre ambos brazos ⁽⁴⁰⁸⁾.

2.5.3.2. Vitamina D en hemopatías malignas no mieloides.

Hay pocos estudios que evalúen el papel de la vitamina D en los desórdenes no mieloides. Muchos estudios preclínicos han demostrado actividad del análogo de la vitamina D EB1089 en la línea celular de mieloma múltiple H929. En este caso, el agente parece promover la apoptosis e inducir la detención del ciclo celular por regulación a la baja de quinasas dependientes de ciclinas, una actividad que es incrementada por TGF- β ⁽⁴⁰⁹⁻⁴¹¹⁾. Hay estudios preclínicos que demuestran que la vitamina D tiene un efecto inhibitorio sobre células linfoides neoplásicas, pero hasta la fecha no se han realizado estudios en humanos ⁽⁴¹²⁾.

2.5.3.3. Vitamina D como moduladora de la respuesta inmune en trasplante alogénico.

Existe un considerable interés en los análogos de la vitamina D por sus efectos inmunomoduladores, lo que podría tenerse en cuenta en los protocolos terapéuticos de pacientes sometidos a TPH alogénico. Los genes VDR son polimórficos en la población humana y esta variación genética en VDR ha sido sometida a investigación en pacientes sometidos a alo-TPH. Los polimorfismos VDR fueron determinados a partir de los distintos lugares de anclaje de las enzimas de restricción ⁽⁴¹³⁾. Aunque las vías exactas por las que estos polimorfismos influyen en la actividad de VDR no se conocen, se han asociado estas variaciones genéticas con variabilidad en la función inmune de la vitamina D y sus otras acciones tales como crecimiento, formación ósea y susceptibilidad a las enfermedades infecciosas.

Cho y colaboradores llevaron a cabo un análisis de 147 pacientes coreanos que fueron sometidos a alo-TPH. Analizaron los polimorfismos para VDR de los receptores y evaluaron retrospectivamente la asociación con el

pronóstico de los pacientes incluyendo infección, EICH, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. Los hallazgos más significativos muestran una correlación entre los polimorfismos del lugar de anclaje de la enzima de restricción Taq1 y la supervivencia, de forma que los heterocigotos (que poseen al menos una copia del alelo C) tienen mejor supervivencia global y libre de enfermedad que los homocigotos TT. El significado funcional de esta variación alélica es desconocido y no se comunicó una asociación directa con una mayor o menor actividad VDR. Este estudio también encontró que los receptores con dos copias para el alelo "A", relacionado con los polimorfismos par el lugar de anclaje de Apal, experimentaron tasas descendidas de EICH aguda e infección ⁽⁴¹⁴⁾. Estos polimorfismos se han relacionado con actividad de VDR de modo que la homocigosidad para el alelo "a" se traduce en mayor actividad ⁽⁴¹⁵⁾.

Middleton y colaboradores estudiaron una cohorte de 88 pacientes con hemopatías malignas mieloides sometidos a TPH alogénico de hermano HLA idéntico correlacionando los polimorfismos VDR de receptores y donantes con el pronóstico ⁽⁴¹³⁾. Al igual que Cho y colaboradores, detectaron una marcada tendencia hacia la disminución de EICH aguda en receptores con genotipo AA (baja actividad de VDR). Los receptores con genotipo aa y elevada actividad de VDR mostraron mayor tendencia a la EICH aguda, aunque no hubo diferencias significativas. Sin embargo, los receptores de donantes con baja actividad VDR (AA) presentaron mayor riesgo de muerte. Esta disminución de supervivencia no fue aplicable para pacientes que recibieron ciclosporina como única profilaxis de EICH.

Bogunia-Kubik y colaboradores publicaron un análisis de 123 pacientes polacos que incluía también enfermos sometidos a alo-TPH de donante no relacionado ⁽⁴¹⁵⁾. Encontraron una asociación entre el genotipo FF, que se asocia a mayor actividad VDR, y el pronóstico del TPH. si el donante y el receptor poseen el genotipo FF, los receptores presentan mayor tasa de EICH. El genotipo Apal, como en otros estudios, también presentaba impacto en el riesgo de EICH. En este caso, al contrario de lo que sucedía en el estudio de Middleton, el genotipo del donante AA (baja actividad VDR) se relacionaba con mayor riesgo de EICH en comparación con el genotipo que tuviera al menos un

alelo a, Al mismo tiempo, los receptores aa (alta actividad VDR) presentaban alto riesgo de muerte y de EICH en comparación con el genotipo de baja actividad VDR, lo que es consistente con otros estudios.

Claramente, el receptor de la vitamina D y su mediación sobre la señalización inmune parece presentar un impacto sobre la reconstitución inmune después del TPH y el riesgo de infección, la enfermedad injerto contra el huésped y el efecto injerto contra enfermedad. Si esta relación fuera bien comprendida, podría suponer un potencial papel terapéutico para la vitamina D (figura 7).

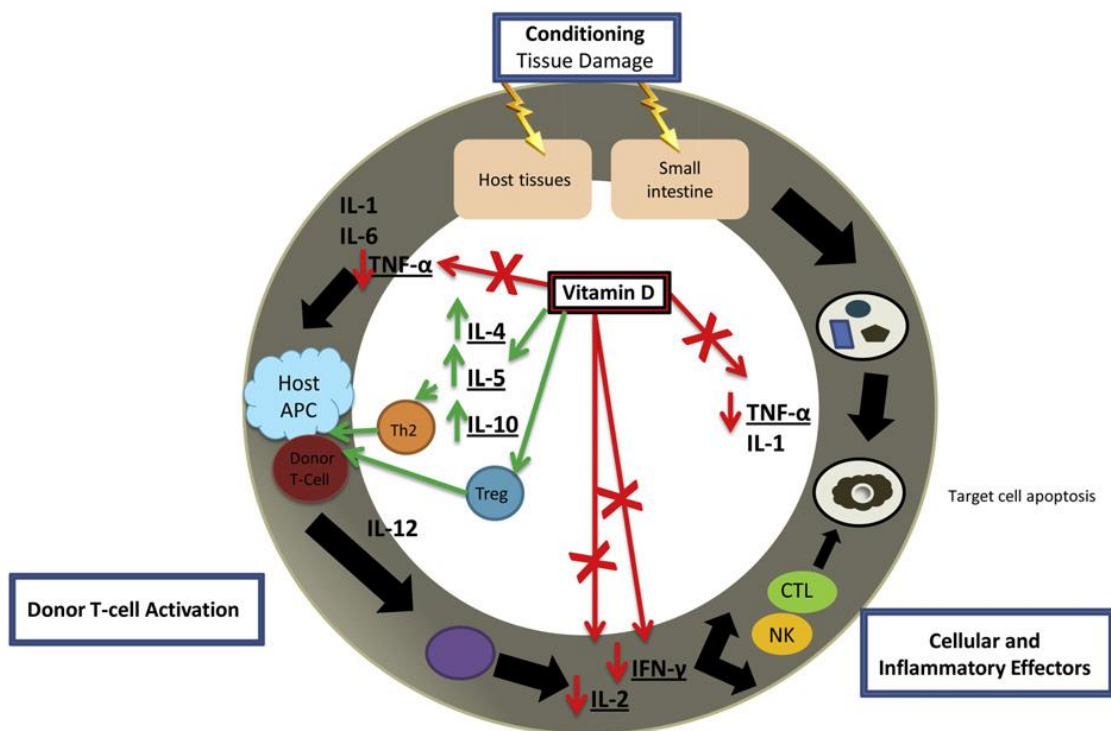


Figura 7. Efectos posibles de la vitamina D sobre el TPH alogénico⁸

⁸ Tomado de la siguiente publicación: Benrashid M, Moyers K, Mohty m, et al. Vitamin D deficiency, autoimmunity and graft-versus-host-disease risk: Implication for preventive therapy. Experimental Hematology 2012; 40: 263-267.

Hipótesis

Merced a su interacción con VDR presente en todas las células del sistema inmunitario, la vitamina D es capaz de inhibir la activación de células dendríticas y la proliferación y producción de citocinas por poblaciones efectoras de linfocitos T, actuando además de forma directa e indirecta sobre los linfocitos B. Todo este potencial inmunomodulador permitiría su aprovechamiento terapéutico en la compleja interacción entre donante y receptor que se genera tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En base a este efecto, su administración en el periodo peri y postrasplante podría disminuir el riesgo de EICH, una enfermedad que condiciona la morbilidad y mortalidad de los pacientes trasplantados, reduciendo los requerimientos de tratamiento inmunosupresor y mejorando el pronóstico de estos enfermos ^(415,416).

Objetivos

1.- Analizar el efecto de la administración de vitamina D sobre la incidencia y severidad de la EICH tanto aguda como crónica en pacientes sometidos a AloTPH.

2.-Evaluar la seguridad y el perfil de efectos adversos del fármaco en sus diferentes dosificaciones y el efecto del mismo sobre los niveles de vitamina D de los pacientes.

3.-Establecer una correlación entre los parámetros clínicos valorados (incidencia de EICH aguda y crónica, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, tasa de infección) y los parámetros biológicos (marcadores de activación del sistema inmune).

4.-Describir en el subgrupo de pacientes con EICH aguda y durante la reconstitución inmune que se produce en los primeros 100 días postrasplante las diferentes poblaciones celulares, los signos de activación linfocitaria y el patrón de citocinas plasmáticas, comparándolos con los objetivados en el grupo sin EICH.

Material y métodos

1. Pacientes

Se incluyeron un total de 150 pacientes procedente de 7 centros en España que firmaron consentimiento informado para participar en el ensayo fase I/II titulado "efecto inmunomodular de la vitamina D postrasplantealógico: ensayo clínico fase I-II multicéntrico" código del protocolo Alovita-1. Es un ensayo prospectivo multicéntrico a nivel nacional para evaluar dosis y eficacia de la vitamina D en la prevención de la EICH y coordinado desde el servicio de Hematología del hospital Virgen del Rocío de Sevilla. El ensayo clínico original fue registrado en www.clinicaltrialsregister.eu como EudraCT: 2010-023279-25.

El ensayo fue aprobado por el Comité Autonómico de Ensayos Clínicos de Andalucía y por los comités éticos locales de todos los centros participantes. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los postulados éticos de la revisión del año 2000 de la declaración de Helsinki.

Los centros participantes e investigadores principales se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Investigadores y centros participantes.

Nº	Centro	Localidad	Investigador principal
1	Hospital Universitario Virgen del Rocío	Sevilla	Dra. Rocio Parody Porras
2	Hospital de Especialidades de Jerez	Jeréz de la Frontera	Dra. Raquel Saldaña Moreno
3	Hospital Clínico de Salamanca	Salamanca	Dr. Fermín Martín Sánchez-Guijo
4	Institut Català d'Oncologia. Hospital Germans Trias i Pujol	Badalona	Dra. Christelle Ferrà i Coll
5	Hospital Vall d'Hebron	Barcelona	Dr. David Valcárcel Ferreiras
6	Instituto de Hematología y Oncología, Hospital Clínic	Barcelona	Dra. Carmen Martínez
7	Hospital Universitario Carlos Haya	Málaga	Dra. M ^a Ángeles Cuesta

El **periodo de inclusión** del ensayo fue desde 12 de mayo del 2011 hasta el 7 de febrero de 2014 con el paciente número 150. El grupo 1 de control se completo el 11 de Julio de 2012 con el paciente número 50 y el grupo 2 el 24 de mayo de 2013 con el paciente número 100.

Para la asignación del tratamiento se estableció un sistema de comunicación continua con el coordinador responsable de la distribución de pacientes por grupo (UCICEC del hospital Virgen del Rocío), de forma que se notificaron los pacientes que fueron incorporándose con un control efectivo de los grupos.

1.1. *Criterios de inclusión*

- ✓ Edad mayor o igual a 18 años.
- ✓ Debe cumplir todos los criterios para proceder a trasplante alogénico.
- ✓ El paciente o su representante legal deben firmar un documento de consentimiento informado aprobado por el Comité Etico de Ensayos Clínicos.

1.2. *Criterios de exclusión*

- ✓ Hipercalcemia igual o superior a 10.5 mg/dL.
- ✓ Insuficiencia renal con creatinina mayor o igual al doble del límite superior de la normalidad (1.1 mg/dL).
- ✓ Participación en otros ensayos clínicos en los que la terapia o intervención pueda interferir en los resultados del estudio.
- ✓ Pacientes que recibirán inmunoprolifaxis de EICH con timoglobulina o profilaxis de EICH que incluya depleción de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* (globulina antilinfocitaria T, ATG).
- ✓ Pacientes que reciban trasplante de donante haploidéntico.

Se consideraba *criterio de retirada* del ensayo cualquier circunstancia que obligara al cambio de pauta de tratamiento. Como causa más probable se contempla la intolerancia a los fármacos o efectos adversos graves.

1.3. *Diseño del estudio*

Los pacientes fueron incluidos en tres grupos de 50 de pacientes reclutados de forma secuencial tal como se detalla a continuación:

- **Grupo 1 (control -CG de siglas en inglés "control group"-):** este grupo no recibió tratamiento.
- **Grupo 2 (cohorte vitamina D dosis bajas -LdD de siglas en inglés *low dose vitD*-):** que participó en el estudio una vez reclutado el grupo control y que recibió tratamiento con vitamina D por vía oral desde el día -5 pretrasplante hasta el día +100 tras el trasplante a dosis de **1000 UI** al día (15 gotas diarias).
- **Grupo 3 (cohorte vitamina D dosis altas - HdD de siglas en inglés "*High dose vitD*"-):** que, una vez reclutado el grupo 2, recibió tratamiento con vitamina D por vía oral desde el día -5 pretrasplante hasta el día +100 tras el trasplante a dosis de **5000 UI** al día (2,5 ml de la medicación del estudio con una jeringuilla suministrada por el servicio de Farmacia).

Del total de 150 pacientes incluidos en el ensayo, 6 fueron considerados no evaluables (2 pacientes en GC, 3 pertenecientes al LdD y 1 al HdD):

- 5 pacientes por no cumplir las especificaciones del protocolo:
 - 2 pacientes recibieron ATG.
 - 2 pacientes tenían un donante haploidéntico.
 - 1 paciente no tomaba la medicación.
- 1 paciente finalmente no se llegó a trasplantar.

La decisión sobre la dosis empleada de vitamina D en el estudio se tomó en base a la bibliografía publicada al respecto⁹ (nota a pie de página).

Todos los datos fueron verificados y actualizados por los responsables de cada institución y revisados para evitar casos duplicados.

⁹ Los artículos de interés para suplementación con vitamina D son los siguientes: "Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials", publicado en BMJ en 2009 por los autores H A Bischoff-Ferrari, B Dawson-Hughes, HB Staehelin y colaboradores así como "Vitamina D deficiency in adults", publicado en Australian Prescriber en 2010 por Devina Joshi, Jacqueline R Center, John A Eisman y colaboradores.

Las características de los pacientes se detallan en la *tabla 2*. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos excepto para la edad, siendo los pacientes pertenecientes al grupo de bajas dosis de vitamina D (LdD) mayores que en los otros dos grupos (50.5 años en LdD frente a 47.5 y 44.7 en GD y HdD, respectivamente). Se empleó fundamentalmente como profilaxis de EICH la asociación de un inhibidor de calcineurina (CsA o TKR) con metotrexate (MTX) o mofetil micofenolato (MMF) o la combinación de tacrólimus y sirolimus (TKR/SL).

Tabla 2. Características de los pacientes.

Pacientes N= 144(%)	CG 48(33,3%)	LdD 47(32.6%)	HdD 49(34%)	p-valor
Edad mediana (SD)	47.5 (15.4)	50.5 (12.7)	44.7 (12.2)	0.01
Sexo:				
-hombre N°(%)	22/53.7	25/53.2	25/51	0.96
Diagnostico N°(%)				
-LMA/SMD	27 (67.5)	28 (59.6)	25 (51)	0.51
-LLA	6 (15)	7 (14.9)	12 (24.5)	
-LNH/LH	5 (12)	6 (12.8)	9 (18.4)	
-Otros	2 (5)	6 (12.8)	3 (6.1)	
Donante no familiar: N°(%)	20 (48)	21 (44.7)	20 (40.8)	0.80
Fuente N(%)				
-Sangre periférica	36 (85.7)	44 (93.6)	45 (91.8)	0.41
-Médula ósea	6 (14.3)	3 (6.4)	4 (8.2)	
No mieloablativo N°(%)	23 (54.8)	34 (73.9)	27 (56.3)	0.11
Profilaxis de EICH: N°(%)				
-CsA/MTX	18 (42.9)	13 (27.7)	18 (36.7)	0.28
-TKR/MTX	10 (23.8)	9 (19.1)	5 (10.2)	
-TKR/SL	14 (33.3)	23 (48.9)	24 (49)	
-Others		2 (4.3)	2 (4.1)	
Estado de la enfermedad N°(%)				
-Precoz	18(41.8)	20(42.5)	18(37.5)	0.86
-Avanzado	25(58.1)	27(57.4)	30(62.5)	

Además de la recogida de muestras biológicas detalladas en siguiente apartado, se exigía la evaluación periódica en los días -5, +1, +7, +14, +21, +56, +100 y +150 de los pacientes con los siguientes parámetros:

-Signos de EICH: signos/síntomas de EICH aguda en piel, hígado y/o tubo digestivo, registrándose estadio global y por órgano afecto. En todas la visitas excepto en el día -5.

-Analítica estándar: incluía bioquímica general (perfil básico con ionograma, hepático y renal) y hemograma.

- Efectos adversos: según apartado 1.3. de seguridad.

-Tratamiento concomitante.

1.4. Seguridad.

La seguridad se evaluó en los pacientes que recibieron el fármaco de estudio. Se recogieron todos los efectos adversos que sucedieron durante todo el periodo de estudio hasta la visita de control del día +150.

Se emplearon las siguientes definiciones:

Acontecimiento adverso se definió como una observación clínica imprevista o anormal que no es beneficiosa para el paciente.

Acontecimiento adverso grave se definió como cualquier experiencia que es fatal o amenazante para la vida, que produce una alteración persistente o significativa (según el investigador principal), que requiere la hospitalización del paciente o la prolongación de la hospitalización, una anomalía congénita, o una sobredosis de los fármacos del estudio. Cualquier toxicidad de grado 4 se considerara un acontecimiento adverso grave.

Los investigadores de cada centro debían comunicar inmediatamente al promotor todos los acontecimientos adversos graves. El promotor notificaría a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios todas las sospechas de reacciones adversas graves y a la vez inesperadas asociadas a los medicamentos en investigación. El plazo máximo de notificación sería de 15 días naturales a partir del momento en que el promotor hubiera tenido conocimiento de la sospecha de reacción adversa.

1.5. Muestras biológicas.

La extracción de las muestras biológicas se llevó a cabo en los siguientes momentos postrasplante:

- Días -5, +1, +7, +14 y +21 postrasplante: 10 ml de sangre periférica en heparina para determinación de niveles de vitamina D en plasma.
- Días +1, +7,+14, +21, +56, +100: 10 ml de sangre periférica en tubo de gelosa para estudio de citocinas en el suero obtenido mediante citometría de flujo.
- Días -5, +1, +7, +14 y +21 postrasplante: 10 ml de sangre periférica en heparina para determinación de niveles de vitamina D en plasma.
- Días +1, +7,+14, +21, +56, +100: 10 ml de sangre periférica en tubo de gelosa para estudio de citocinas en el suero obtenido mediante citometría de flujo.
- Días +21, +56, +100: 10 ml de sangre periférica en tubo de heparina para estudio de diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune.

Los estudios biológicos se llevaron a cabo en al menos los 10 primeros pacientes de cada cohorte de los pacientes incluidos en el hospital Virgen del Rocío:

- 16 pacientes en el GC
- 10 pacientes en LdD
- 14 pacientes en HdD.

Además se analizarón las mismas poblaciones en cuatro controles sanos.

2. Métodos

2.1. Estudios de inmunofenotipo

2.1.1. Materiales

A continuación se enumeran los reactivos necesarios para llevar a cabo los estudios de citometría de flujo:

- Brefeldina A procede de Sigma-Aldrich, nos permite inhibir la secreción de proteínas y por lo tanto podemos emplearla para el estudio de

proteínas intracelulares con activación linfocitaria. Para activación de los linfocitos T se empleó: PMA (Phorbol 12-Myristato 13 acetato) de Sigma-Aldrich e Ionomycin calcium salt from streptomyces conglobatus de Sigma-Aldrich.

- En estudios de membrana, Lysing Solution 10X Concentrate (BD FACS) se utiliza para lisar eritrocitos bajo condiciones hipotónicas preservándose los leucocitos. Para el estudio de proteínas intracelulares se empleó Cell Permeabilization Kit (FIX & PERN). Las muestras se procesan en tubos de 5 ml de Round Bottom Test Tubes, 5ML (Falcon).
- Además como fluidos necesarios en el procesamiento y adquisición de muestras utilizamos: Sheath Fluid (BD FACSToW), Shutdown Solution (BD FACS), CellWASH (BD Biosciences) y Clean Solution (BD FACS).
- Para el control y calibración de los citómetros se emplearon Cytometer Setup & Tracking (CST) Beads Kit (BD) y SPHERO Rainbow Calibration (Cytognos). La calibración y compensación de los citómetros se lleva a cabo según las recomendaciones de Euroflow.
- Los estudios de expresión proteica del gen FOXP3 en linfocitos T se desarrollaron con el kit de FOXP3 Staining Buffer Set de eBioscience (San Diego, CA, EEUU).
- Para llevar a cabo el estudio de citoquinas solubles, usamos Human Th1/Th2 Cytokine Kit II para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN γ .
- Utilizamos el citómetro de flujo modelo FACSCanto II (Becton Dickinson Bioscience San Jose, CA, EEUU) y los programas informáticos: Infincyt 7 (Cytognos S.L. Salamanca, España) y FACSDiva (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, EEUU)
- El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS software program (SPSS .0, Chicago IL).
- Los anticuerpos monoclonales, empleados para análisis por citometría de flujo se detallan a continuación en la tabla 3:

Tabla 3: Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio.

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Procedencia
BDCA1	PE	Mouse IgG1κ	F10/21A3	BD Pharmingen
CCR7	PE	Mouse IgG2A	150503	R&D Systems
CD11a	FITC	Mouse BALB/c IgG2a, κ	G-25.2	BD Biosciences
CD11C	PerCP Cy5.5	Mouse BALB/c IgG1, κ	B-ly6	BD Pharmingen
CD123	APC	Mouse IgG2a	AC145	Immunostep
CD127	PE	Mouse IgG1κ	HIL-7R-M21	BD Pharmingen
CD14	APC-H7	Mouse IgG2b, κ	MYP9	BD Biosciences
CD158a	FITC	Mouse IgM, κ	HP-3E4	BD Pharmingen
CD16	PE	Mouse IgG1	3G8	Beckman Coulter
CD16	V450	Mouse IgG1	3G8	BD Horizon
CD16	FITC	Mouse BALB/c IgG2a, κ	CLB/fcGran1	BD Biosciences
CD161	PE	Mouse C3H	DX12	BD Biosciences
CD25	FITC	Mouse IgG1κ	2A3	BD Biosciences
CD3	PerCP Cy5.5	Mouse IgG1κ	SK7	BD Biosciences
CD33	PerCP Cy5.5	Mouse BALB/c IgG1, κ	P67.6	BD Biosciences
CD4	PerCP Cy5.5	Mouse IgG1κ	SK3	BD Biosciences
CD40L	APC	Mouse IgG1κ	TRAP1	BD Pharmingen
CD45	V500	Mouse IgG1, κ	2D1	BD Biosciences
CD45RA	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	L48	BD Biosciences
CD56	PE	Mouse IgG1, κ	MY31	BD Biosciences
CD56	APC	Mouse BALB/c IgG2b, κ	NCAM16.2	BD Biosciences
CD64	PE	Mouse BALB/c IgG1, κ	10,1	BD Biosciences
CD8	APC	Mouse BALB/c IgG1, κ	SK1	BD Biosciences
CD86	PE-Cy7	Mouse IgG2b, κ	IT2.2	BioLegend
CD94	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	HP-3D9	BD Pharmingen
Foxp3	APC	Rat IgG2a κ	PCH101	eBioscience
HLA-DR	APC	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Biosciences
HLA-DR	FITC	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Biosciences
HLA-DR	V450	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Horizon
INF-γ	PE	Mouse IgG1κ	B27	BD Pharmingen
NKAT2	PE	Mouse IgG2a, κ	DX27	BD Pharmingen
NKB1	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	DX9	BD Pharmingen
Lymphogram	CD8-CD19-FITC	IgG2a-IgG1		Cytognos
	CD3-CD56-PE	IgG2a-IgG2b		
	CD4-PECy5	IgG1		

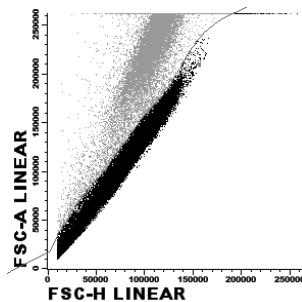
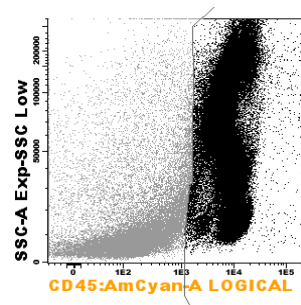
2.1.2. Estudio de proteínas de membrana

El protocolo para marcar antígenos de membrana comprende los siguientes pasos:

1. Añadir el volumen apropiado de cada anticuerpo frente al antígeno de membrana
2. Añadir 100µl de muestra.
3. Mezclar bien.
4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
5. Añadir 2mL de FACS Lysing solution 1X (1mL de FACS Lysing solution diluido en 9ml de agua destilada).
6. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Centrifugar durante 5 minutos a 2000rpm.
8. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur.
9. Lavar con 2mL de Cell-Wash+Albúmina.
10. Mezclar bien.
11. Centrifugar durante 5 minutos a 2000rpm
12. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur dejando aproximadamente 50µL en el tubo.
13. Resuspender el pellet en 300µL de FACS Flow + Albúmina.
14. Adquirir en el citómetro FACSCanto II empleando el programa FACS Diva.
15. El análisis se lleva a cabo con el programa Inficyt (Cytognos).

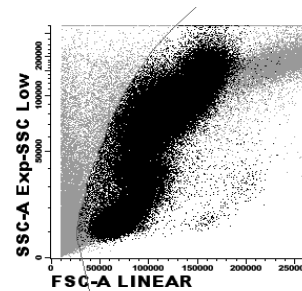
Estrategia de análisis: En todos los estudios realizados se comienza con la misma estrategia de análisis dirigida a identificar la población hematológica utilizando el diagrama que enfrenta CD45, el antígeno panleucocitario, a SSC y a excluir tanto los dobletes según el diagrama que enfrenta FSC-A/FSC-H como el debris por las características de dispersión de luz de las células (FSC/SSC) respectivamente.

Seleccionamos la población hematológica CD45+.



Excluimos los dobletes mediante una selección en el diagrama que enfrenta FSC-A/FSC-H.

Por último seleccionamos la población que tenga un FSC y SSC adecuado.



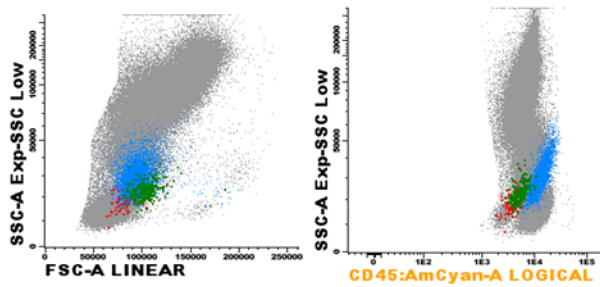
2.1.2.1. Análisis inmunofenotípico de CDs

Para evaluar inmunofenotípicamente las CDs hicimos las combinaciones de anticuerpos monoclonales:

V450	V500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PE Cy7	APC	APCH7
CD16	CD45	HLADR	BDCA1	CD11c	CD86	CD123	CD14

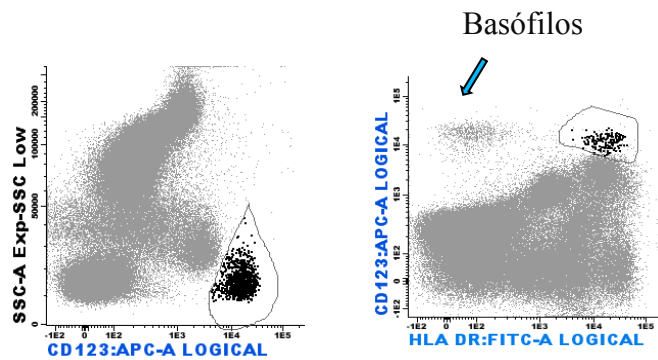
Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana generérico y se adquiere 500.000 eventos para su análisis.

Se identifican tres poblaciones diferentes:



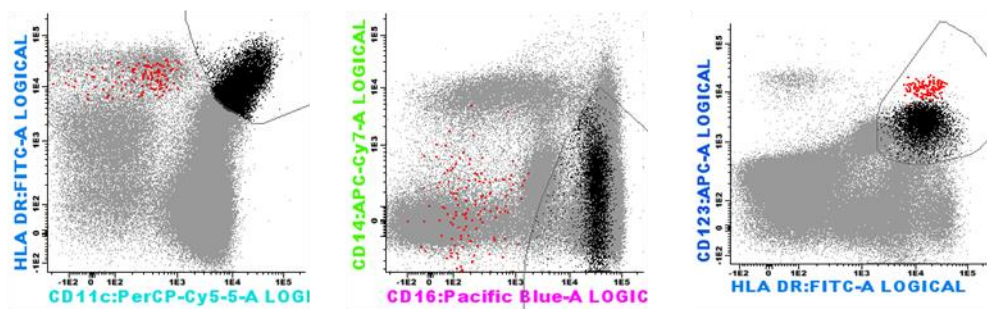
- ❖ **Células dendríticas plasmocitoides:** de fenotipo HLADR+ CD123++ CD11c- CD16- CD14- BDCA1- CD45+.

Las identificamos por su expresión fuerte de CD123 y positivas para HLADR según la siguiente figura:

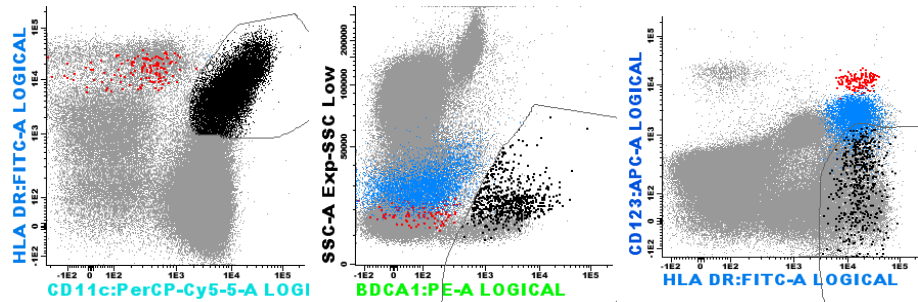


- ❖ **Células dendríticas derivadas de monocitos:** de fenotipo HLADR+ CD123+d CD11c+ CD16++ CD14-/++ BDCA- CD45+.

Las identificamos por su expresión de CD11c junto con expresión intensa de CD16 y negativas o débilmente positivas para CD14. Son débilmente positivas para CD123 y positivas para HLADR:



- ❖ **Células dendríticas mioeloides BDCA1:** HLADR+ CD123- CD11c+ CD16- CD14- BDCA+ CD45+. Se selecciona por su positividad en CD11c y BDCA1, siendo negativas para CD123 y positivas para HLADR. Además se comprueba que su negatividad para CD16 y CD14.

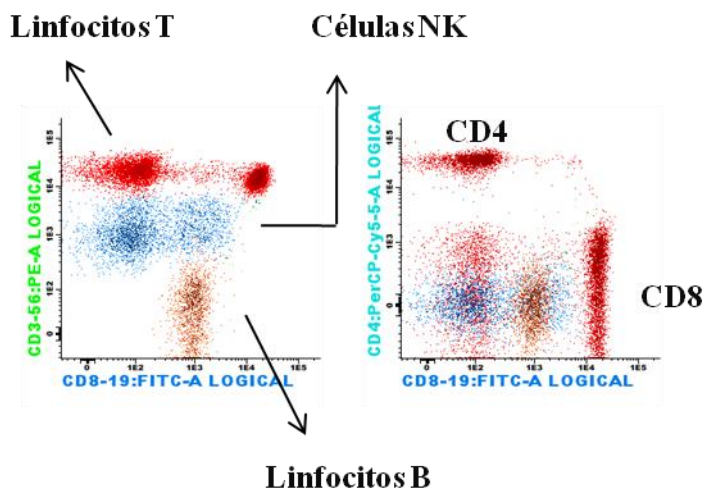


2.1.2.2. Análisis inmunofenotípico de poblaciones linfocitarias

Para evaluar inmunofenotípicamente las poblaciones celulares utilizamos la combinación de anticuerpos monoclonales:

FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD8-CD19	CD3-CD56	CD4	HLADR

Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana generérico y se adquiere 100.000 eventos para su análisis.



Se separan los linfocitos T según su expresión de **CD3 (en rojo)** en la positividad fuerte en PE. Además se separan según su expresión de CD4 y CD8, identificando los CD4+, CD8+, dobles positivos (CD4+CD8+) y dobles negativos (CD4-CD8-). Además en azul se diferencia la población de **células NK CD56+** que se sitúan en el positivo débil en PE. Por último,

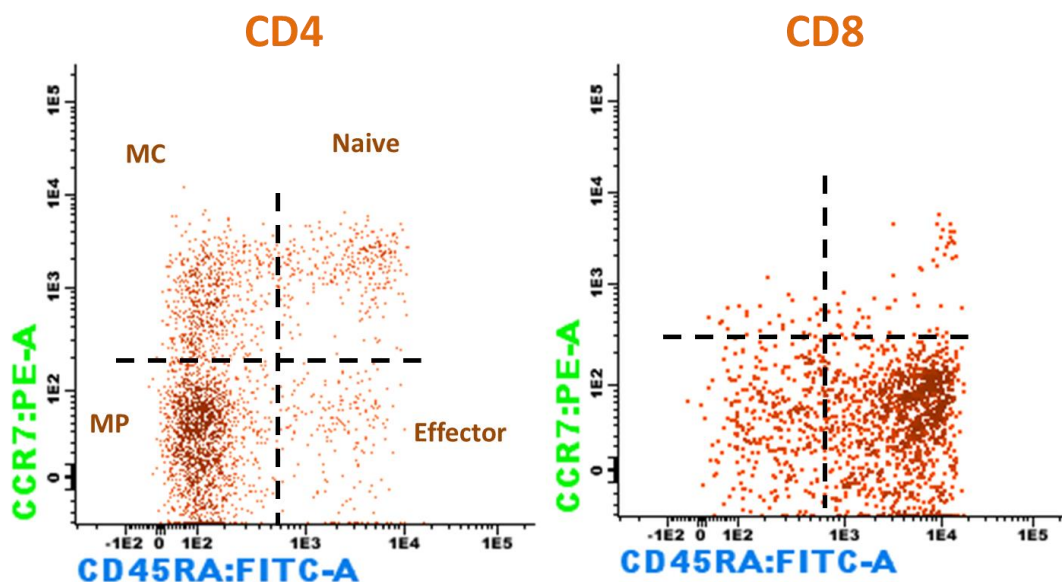
y dobles negativos (CD4-CD8-). Además en azul se diferencia la población de **células NK CD56+** que se sitúan en el positivo débil en PE. Por último,

tras retirar la población de células NK y linfocitos T CD8 podemos separar los **linfocitos B CD19+** en naranja colocada en la positividad débil de FITC.

2.1.2.2.1. Análisis inmunofenotípico de linfocitos T naive/memoria/efector

Se emplea la combinación de anticuerpos CD45RA-PE y CCR7-FITC para determinar los linfocitos T naive, efectores y de memoria central y periférica tanto en los linfocitos T CD4 como en los linfocitos T CD8. Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana generérico y se adquiere 100.000 eventos para su análisis. Según estas proteínas de membrana son:

- linfocitos T naive: CD45RA+CCR7+
- linfocitos T efectores: CD45RA+CCR7-
- linfocitos T memoria central (MC): CD45RA-CCR7+
- linfocitos T memoria periférica (MP): CD45RA-CCR7-

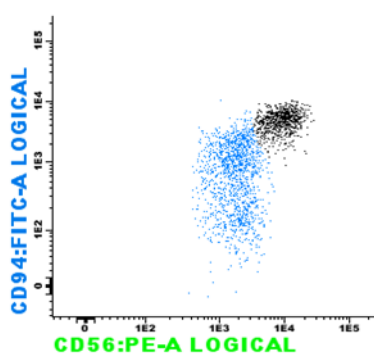


2.1.2.2.2. Análisis inmunofenotípico de células NK

Se utiliza las siguientes combinaciones de anticuerpos:

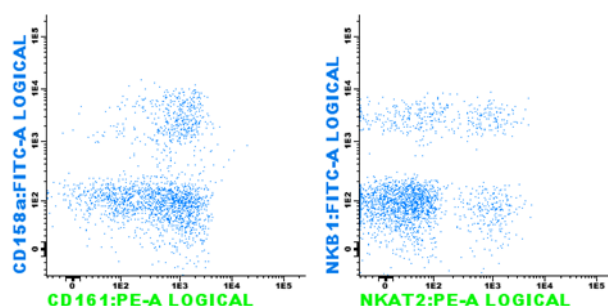
FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD94	CD56	CD3	HLADR
CD11a	CD16	CD3	CD56
CD158a	CD161	CD3	CD56
NKB1	NKAT2	CD3	CD56

Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana generérico y se adquiere 100.000 eventos para su análisis.



Se identifican las células NK con expresión débil de CD56 denominadas CD56 "weak" y aquellas que expresan más intensamente este marcador CD56 "bright" (en negro). Estas últimas se caracterizan por mayor intensidad en la expresión de CD94 en práctica ausencia de CD16.

Además se identifica la expresión de diferentes receptor KIR como CD158a, CD161, NKB1 y NKAT2.

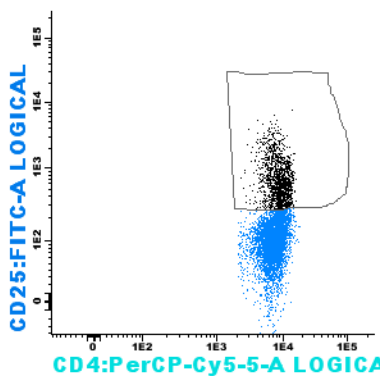


2.1.2.2.3. Estudio de linfocitos T reguladores

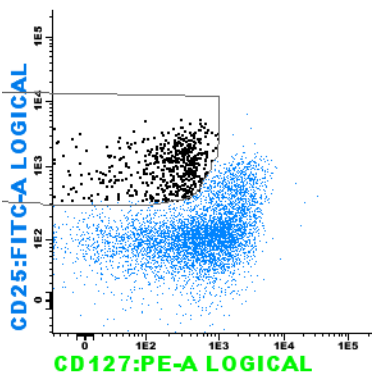
Las muestras se marcaron con los anticuerpos de membrana (CD25-FITC, CD127-PE y CD4-PerCPCy5.5.). Incubamos a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo de incubación las

células se lavaron de nuevo con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 1mL de Fixation/Permeabilization Buffer (25% fixation/permeabilization concentrate 75% de Fixation/Permeabilization Diluent). Incubamos a 4°C durante 30 minutos, lavamos en dos ocasiones con 2mL de 1X Permeabilization Buffer y resuspendimos en 100µl de 1X Permeabilization Buffer. En este momento añadimos el anticuerpo Foxp3-APC. Incubamos durante 30 minutos, a 4°C y oscuridad. Finalmente centrifugamos a 2000rpm durante 5 minutos resuspendimos en PBS y adquirimos la muestra en el citómetro de flujo.

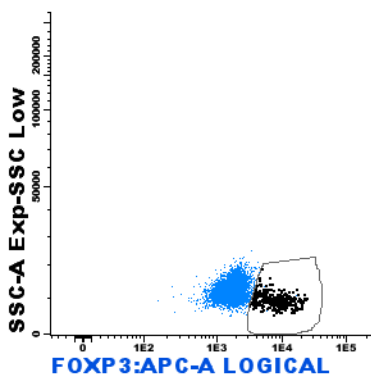
Empleamos la siguiente estrategia de análisis:



-Seleccionamos los linfocitos T CD4+ y de estos aquellos que expresan CD25



- De éstos seleccionamos los negativos o débilmente positivo para CD127



-Nos quedamos con los CD4+CD25+CD127-/+d positivos para Foxp3

2.1.3. Activación de linfocitos

Para poder valorar activación linfocitaria establecimos 2 condiciones de estudio:

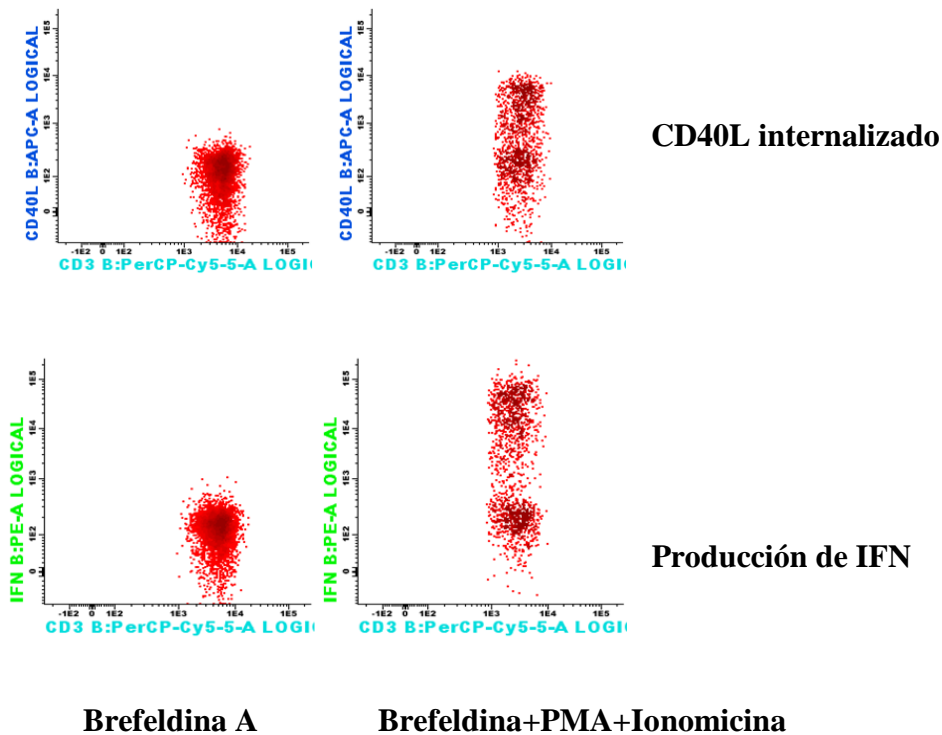
-condición control: 500 μ L de sangre periférica + 2 μ L brefeldina A

-condición de activación: 500 μ L de sangre periférica + 2 μ L brefeldina A + 20 μ L PMA y 1 μ L ionomicina.

En una placa de 48 pocillos se añadieron 500 μ L de sangre periférica junto con 500 μ L de medio de cultivo RPMI. A cada una condiciones se añade Brefeldina A a una concentración final de 10 μ g/ml para poder inhibir la secreción de proteínas y por lo tanto determinar intracelularmente la producción de IFN y la expresión de CD40L. Además en la condición de activación se añade 20 μ L PMA (1 μ g/mL) y 1 μ L ionomicina (concentración 0.5mg/mL). Se incuba durante 4 horas antes del marcaje por citometría. Transcurrido este tiempo se recoge 200 μ l de muestra en tubos de citometría. El marcaje de membrana se realizó con los anticuerpos monoclonales anti-CD25-FITC y anti-CD3 PerCP-Cy5.5 . Incubamos durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para el marcaje intracitoplasmático, utilizamos el kit Intrastain que permite fijar y permeabilizar la membrana celular, manteniendo intacta la estructura, morfología y superficie de las células. Para ello, después del marcaje de de membrana se añadieron 100 μ L de la solución A (fijador celular) al tubo de citometría durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, lavamos con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 100 μ L de la solución B para permeabilizar la membrana y añadir seguidamente los anticuerpos intracelulares: IFN- γ PE y CD40L APC. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras lavar el exceso de anticuerpo, las células se re-suspendieron en 300 μ l de Facs Flow y se adquirieron en el citómetro.

La estrategia de análisis consiste en determinar la producción de IFN y la expresión de CD40L en el tubo de activación frente a los linfocitos sin activar solo incubados con brefeldina A.

Diagrama de izquierda linfocitos T CD3+ sólo con brefeldina y el diagrama de la derecha con PMA e ionomicina



2.2 Citocinas en suero

Para poder realizar el análisis de las citoquinas solubles partimos de 50µl de suero obtenido de la sangre periférica de los pacientes en los momentos especificados previamente. En el estudio se empleó el Kit comercial BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, que nos permitió estimar la cantidad de las citoquinas solubles en suero de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα e IFNγ. El protocolo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, reconstituimos el estándar liofilizado con 2ml de Assay Diluent. A partir del estándar preparamos diluciones seriadas de concentraciones conocidas, de manera que podemos establecer una recta patrón. A continuación, se preparó la mezcla de las esferas de captura para cada una de las citoquinas

a determinar. Para reducir resultados falsos positivos por efecto de las proteínas presentes en suero, centrifugar la mezcla de las esferas y retiramos el sobrenadante para resuspender en Serum Enhancement Buffer (en el mismo volumen que hemos retirado de la mezcla) e incubarlo durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Cada uno de los tipos de esferas emite una fluorescencia de diferente intensidad que se detecta en FL3, lo que nos permite realizar un análisis simultáneo de las seis citoquinas solubles. Una vez preparados todos los reactivos necesarios, se mezclaron 50µL de las esferas de captura, 50µL de cada una de las diluciones estándar o 50µL de la muestra problema y 50µL del anticuerpo de detección (conjugado en PE). Incubamos durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadió 1mL de Wash Buffer y centrifugamos a 200g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y re-suspendimos en 300µL de Wash Buffer. Adquirimos en un citómetro FACSCanto II, utilizando el programa FACS Diva software. El análisis de datos se desarrolla con el programa FCAP Array™ Software versión 3.0 (BD).

2.3. Estudios de niveles de 25-hidroxiViD.

Las concentraciones séricas de 25-hidroxiViD fueron determinadas a partir de las muestras sanguíneas mediante un sistema automatizado de electroluminiscencia por inmunoanálisis (Analytics E711), Roche Diagnostics, GmbH (Manheim, Alemania). El límite inferior de detección fue de 10 nmol/l y los coeficientes de variación interno y externo fueron del 5% y del 8% respectivamente.

2.4. Análisis estadístico.

La comparación de variables cuantitativas y cualitativas entre grupos independientes se analizaron mediante prueba t de Student, prueba χ^2 , test exacto de Fisher o test mid-P en tablas 2x2, dependiendo del tamaño de la muestra.

El análisis de la varianza (ANOVA) con medidas repetidas se utilizó para el análisis de los cambios en los niveles. Se realizaron pruebas post-hoc mediante la Corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Se utilizó el método de Kaplan-Meier para calcular las probabilidades de supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y se empleó la prueba de long-rank para las comparaciones sin ajustar. Por otro lado se analizaron la recaída, mortalidad no asociada a la recaída y la probabilidad de EICH en un marco de riesgos competitivos utilizando el estimador no paramétrico de incidencia acumulada, y se compararon mediante la prueba de Gray.

Los eventos analizados se calcularon a partir del momento del trasplante de la siguiente manera: mortalidad no asociada a la recaída se definió como muerte por cualquier causa (relacionada con EICH u otro), sin recidiva previa o progresión de enfermedad subyacente; la incidencia de recaídas se analizó desde el trasplante hasta el momento de la recaída en aquellos pacientes en remisión antes o después del trasplante. La supervivencia libre de enfermedad se calculó a partir del trasplante hasta la progresión de la enfermedad o la muerte, y en aquellos pacientes que no alcanzaron respuesta de la enfermedad (remisión completa o parcial) en cualquier momento después del trasplante, se consideraron eventos en el día 100, ya que era la primera fecha para la evaluación completa de la enfermedad. La SG se calculó a partir del trasplante hasta la muerte por cualquier causa, y los pacientes que sobrevivieron fueron censurados en el último seguimiento. Los pacientes que tenían evidencia de injerto fueron evaluables para EICH aguda, mientras que los pacientes que injertaron y sobrevivieron más allá del día +100 tras el trasplante fueron evaluables para EICH crónico. En EICH aguda o EICH crónica se analizó el día de inicio como el tiempo desde el trasplante hasta el evento en un paciente evaluable.

Efectos ajustados en la EICH crónica se estimaron en términos de proporciones de riesgo por modelos de Cox. El efecto de los acontecimientos que tuvieron lugar durante el seguimiento y después del trasplante, como la EICH aguda, fueron analizados por el tratamiento de su

aparición como una covariable dependiente del tiempo en el modelo de Cox.

Las siguientes variables fueron incluidas en el análisis multivariable para EICH crónico: EICH aguda, edad, estado de la enfermedad, tipo de donante, fuente de células madre, el tipo de régimen de acondicionamiento, diagnóstico y profilaxis EICH.

Los datos fueron analizados utilizando SPSS.V.15, Open Source Epidemiologic Statistics para el software de Salud Pública (OpenEpi V.2.3.1) y el paquete CMPSK en R 2.4.1 para el análisis de las curvas de incidencia acumulada en el marco de riesgo competitivo

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas por debajo de un p-valor $p < 0.05$ con un intervalo de confianza del 95% (Dean AG).

Resultados

1. Perfil de seguridad.

No se reportaron efectos adversos graves en el estudio, y específicamente no se comunicó ningún episodio de hipercalcemia relacionado con la administración de vitamina D. La toxicidad observada fue de baja frecuencia y de carácter gastrointestinal. Tal como queda reflejado en la tabla 1, cinco pacientes tuvieron que suspender el tratamiento por intolerancia digestiva.

Tabla 1. Toxicidades relacionadas con el tratamiento con vitamina D.

	Toxicidad global (n)	VitD1000UI(n)	VitD5000 UI(n)
Nausea	10	3	7
Total	5	2	3
Grado 1	5	2	3
Grado 2-3	5	1	4
Diarrea			
Total	10	3	7
Grado 1	5	2	3
Grado 2-3	5	1	4
Toxicidad cardiaca	0	0	0
Toxicidad hepática	0	0	0
Toxicidad neurológica	0	0	0
Laboratorio			
Hipercalcemia	0	0	0

Se utilizaron los criterios de toxicidad del "National Cancer Institute" (NCI) para ensayos onco-hematológicos identificando grado 0 como ausencia de síntomas, grado 1 o leve como síntomas leves que no precisan intervención;

grado 2 o moderado cuando precisan una intervención mínima y/o condicionan alguna limitación de actividad al paciente y, por último, grado 3 o grave cuando requiere hospitalización (limitación del paciente para cuidarse por sí mismo).

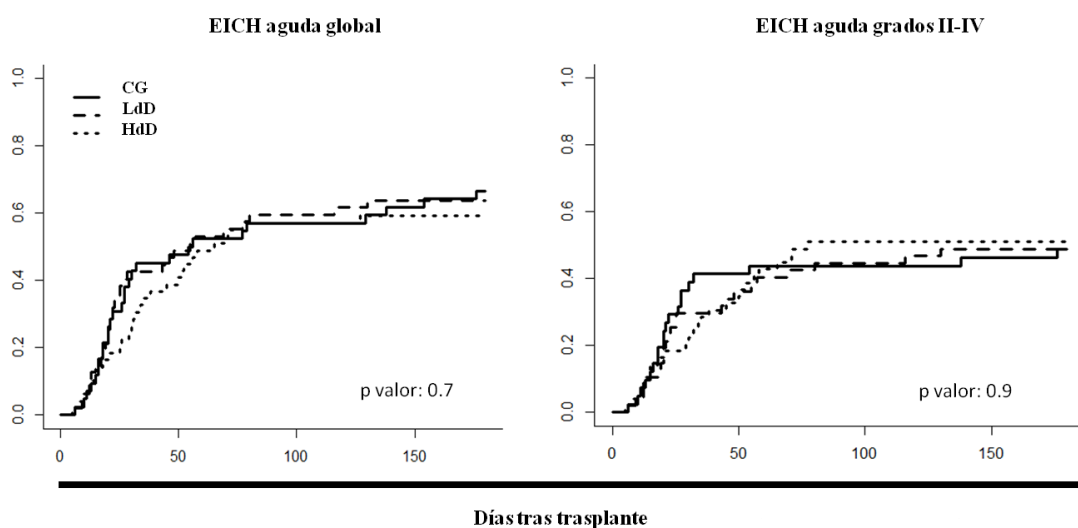
No se comunicaron fallos de injerto en ninguno de los tres grupos; la mediana de células CD34 infundidas fue de $5,5 \times 10^6/\text{Kg}$ (rango $1,2-12,40 \times 10^6/\text{Kg}$). La mediana de recuperación de neutrófilos por encima de $0,5 \times 10^9/\text{L}$ fue de 16 días (rango 10-71 días) y la de plaquetas por encima de $20 \times 10^9/\text{L}$ de 13,1 días (rango 0-94 días).

2. Enfermedad injerto contra huésped.

2.1. EICH aguda.

La incidencia acumulada de EICH aguda global o grado II-IV al día +100 tras el trasplante fue para el grupo control del 57.1% y 43.9% respectivamente, para el grupo de vitamina D de bajas dosis del 59.6% y 44.7% y para el grupo de vitamina D de altas dosis del 57.1% y 51% , sin mostrar diferencias significativas entre los tres grupos tal como se muestra en las figuras 1 y 2 ($p=0.71$ y $p=0.98$ respectivamente).

Figura 1. Incidencia acumulada de EICH aguda global y grados II-IV

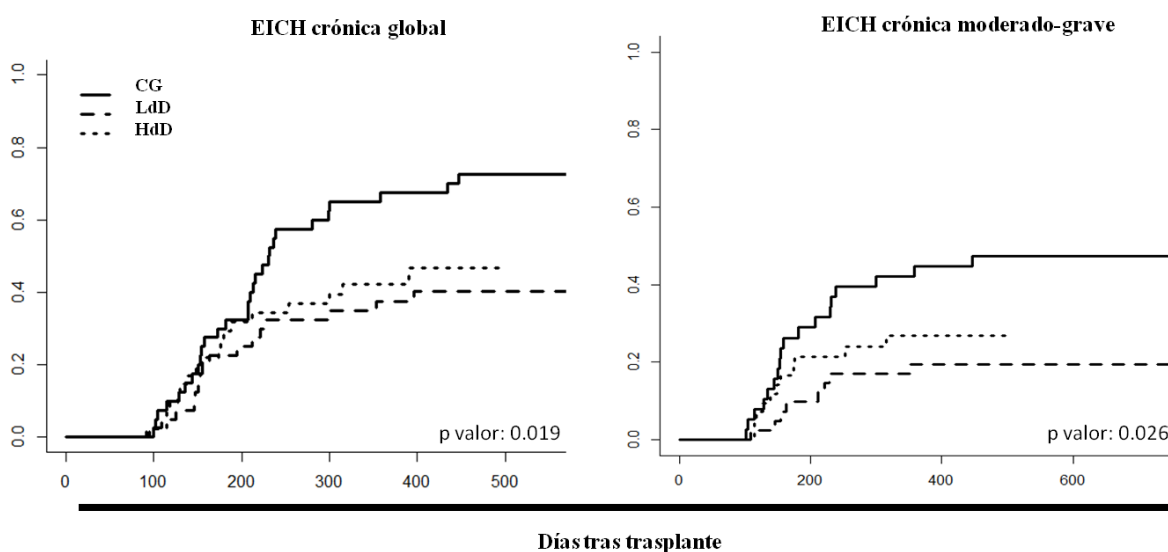


Todos los pacientes que presentaron EICH aguda de grado igual o superior a 2 recibieron tratamiento esteroideo sistémico.

2.2. EICH crónica.

La **incidencia acumulada** de EICH crónica tanto global como grado moderado-severo al año del trasplante fue significativamente más baja entre los pacientes incluidos en el grupo de dosis bajas (LdD: 37.5% y 19.5%, respectivamente) y dosis altas (HdD 42.4% y 27%, respectivamente) en comparación con aquellos pacientes que no recibieron vitamina D (grupo control) (67.5% y 44.7%, respectivamente) con $p=0.019$ y $p=0.026$ para la EICH global y el grado moderado-severo, respectivamente (figura 2).

Figura 2. Incidencia acumulada de EICH crónica global y grado moderado-severo



En el análisis multivariante, únicamente el tratamiento con vitamina D influyó significativamente en el riesgo de desarrollar EICH crónica global o moderada-severa (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Análisis multivariante para la EICH crónica global.

	HR	IC-95%INF	IC-95%SUP	p-valor
Covariante_aGVHD	1,08277545	0,56150216	2,08797539	0,81237196
COHORTES				0,00303523
- Control (Referencia)	1			
- Vit-D Bajas Dosis	0,3171506	0,14944507	0,67305333	0,00277813
- Vit-D Altas Dosis	0,36135827	0,17380473	0,75130175	0,00641715
EDAD	1,01919348	0,99024983	1,04898312	0,19587623
Estatus al trasplante (fase avanzada)	1,19093594	0,62176949	2,28111615	0,59822301
Tipo de donante (NO EMPARENTADO)	1,46180201	0,67386552	3,17105574	0,33658714
Fuente de progenitores (MO)	0,78474184	0,22103614	2,78605908	0,70768365
Acondicionamiento no mieloablativo	0,94832249	0,37385898	2,40549404	0,91104012
LMA/ SMD	1,19353571	0,41416715	3,43949902	0,74319748
Profilaxis de EICH				0,92973902
- CsA/MTX	1			
- TKR/MTX	1,15005836	0,39950792	3,31065841	0,79550518
- TKR/RAPA	0,82915241	0,32728988	2,10056515	0,69282186
- OTRAS INMUNOPROFILAXIS	0,70922891	0,08315197	6,04923309	0,75340171

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza

Tabla 4. Análisis multivariante para la EICH crónica grado moderado-severo.

	HR	IC-95%INF	IC-95%SUP	p-valor
Covariante_aGVHD	0,80152833	0,37092673	1,73200692	0,57360088
COHORTES				0,00313406
- Control (Referencia)	1			
- Vit-D Bajas Dosis	0,22124595	0,08500154	0,57586919	0,00199695
- Vit-D Altas Dosis	0,33723546	0,1427857	0,79649259	0,01318
EDAD	1,02303922	0,98517314	1,06236073	0,2365356
Estatus al trasplante (fase avanzada)	1,12315953	0,52232895	2,41512047	0,76621003
Tipo de donante (NO EMPARENTADO)	2,74053435	1,12563796	6,67224168	0,02637449
Fuente de progenitores (MO)	0,29214057	0,03454501	2,47057741	0,25862294
Acondicionamiento no mieloablativo	0,73354789	0,23194333	2,31993092	0,59787311
LMA/ SMD	1,90648354	0,86192059	4,21695399	0,11113756
Profilaxis de EICH				0,99185326
- CsA/MTX	1			
- TKR/MTX	1,11630973	0,33993943	3,66579256	0,85607732
- TKR/RAPA	0,91266137	0,30687459	2,71430357	0,86946103
- OTRAS INMUNOPROFILAXIS	0,93605742	0,10492271	8,35094232	0,95280919

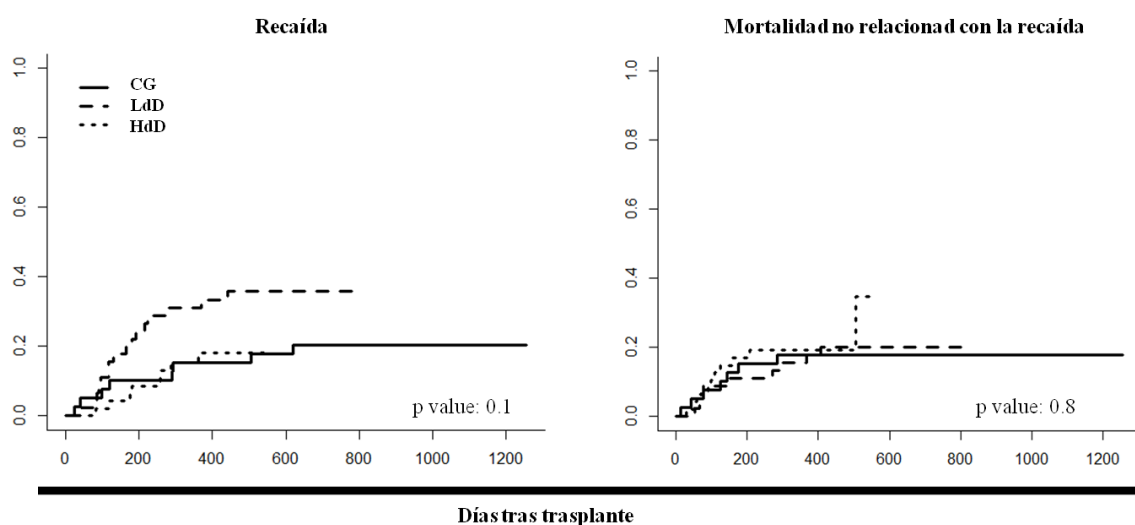
HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza

3. Recaída, mortalidad no relacionada con la recaída y supervivencia global.

La incidencia acumulada de recaída a un año de seguimiento tras el trasplante fue 15.4% en el GC, 31.1% en el LdD y 18.1% en HdD, (p=0.1). Del

mismo modo, tampoco hubo diferencias significativas en la incidencia acumulada de mortalidad no relacionada con la recaída al año de trasplante, siendo del 17.9%, 15.6% y 19.2% para el grupo control, LdD y HdD, respectivamente ($p=0.8$) (figura 3).

Figura 3. Incidencia acumulada de recaída y mortalidad no relacionada con la recaída a un año de seguimiento



Las causas de fallecimiento estuvieron mayoritariamente relacionadas con la recaída en los grupos control y de vitamina D a dosis bajas, mientras que en el grupo de vitamina D a dosis altas la EICH con o sin infección asociada fue la principal causa de muerte (tabla 5).

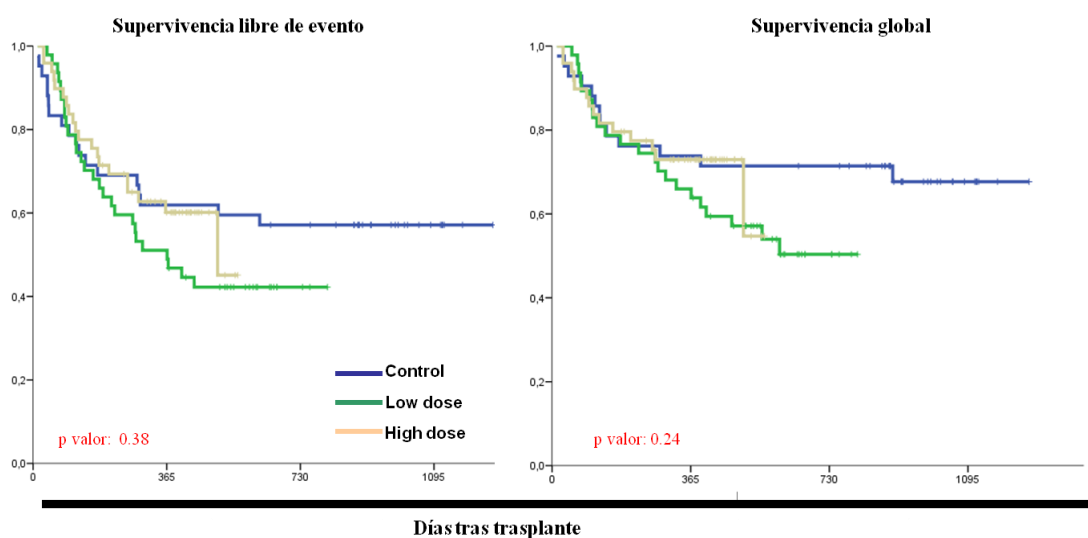
Tabla 5: Causas de éxitus en los grupos de estudio.

	GC (n)	LdD(n)	HdD(n)
Infección	4	4	3
EICH+/-	3	4	7
Infección			
Recaída	4	9	1
Causa	1	2	0
neurológica			
FMO	0	0	1

FMO: Fracaso multiorgánico.

En cuanto al impacto de la vitamina D sobre la supervivencia libre de evento (SLE) y supervivencia global (SG), no se registraron diferencias entre los tres grupos ($p=0.38$ y $p=0.24$ respectivamente). En este sentido, con una mediana de seguimiento de 2 años, la SLE y la SG fue del 57% y 71%, 42% y 50% y 45% y 55% para CG, LdD and HdD, respectivamente (figura 4).

Figura 4. Kaplan-Meier de supervivencia libre de evento y supervivencia global.

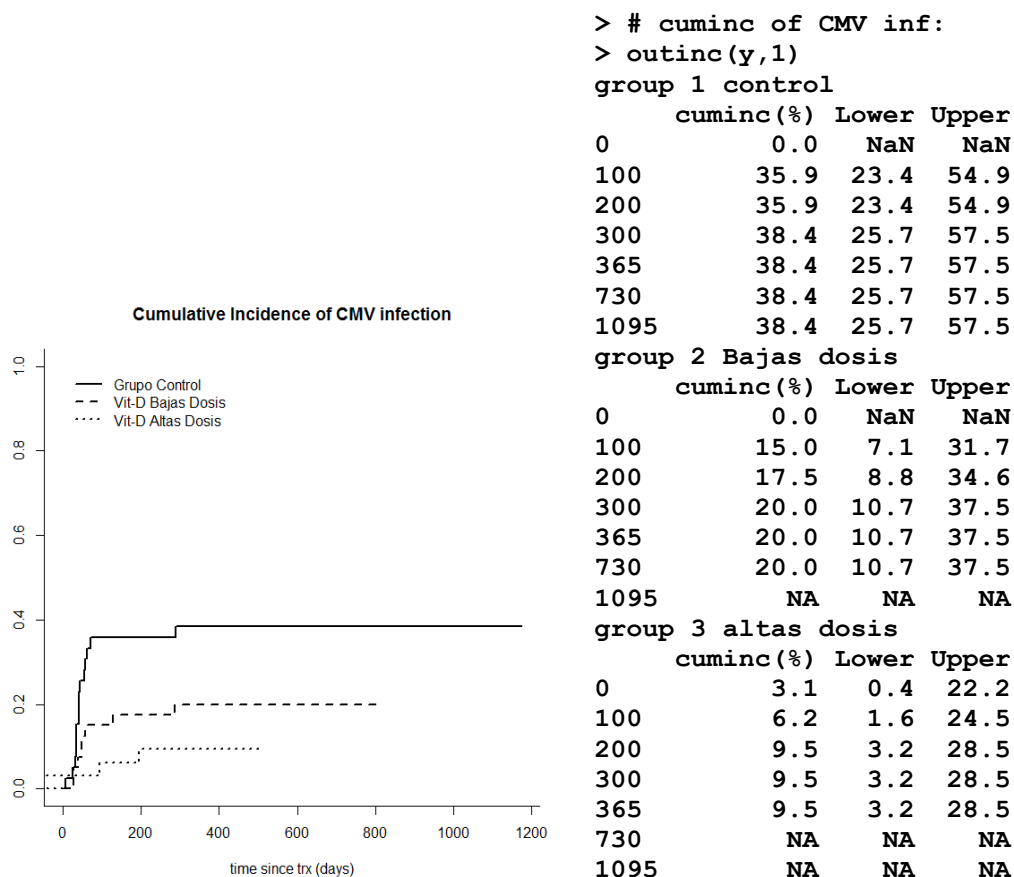


4. Infección por CMV.

Dado que los episodios de infecciones bacterianas y fúngicas no se registraron con suficiente precisión en los diferentes centros y en muchos casos estaban condicionados por el historial previo de infecciones de los pacientes, centramos el estudio en el análisis de la tasa de infección por CMV. Dispusimos de información sobre el 88% de los enfermos incluidos en el ensayo, es decir, sobre 130 pacientes, 44 pertenecientes al grupo control (33%), 45 del grupo de vitamina D a bajas dosis (34,6%) y 41 del grupo de vitamina D a dosis altas (31,5%). La tasa de infección por CMV en los diferentes grupos fue la siguiente: 40,9% en el grupo control, 28,8% en el grupo de vitamina D a dosis bajas, 24,3% en el grupo de vitamina D a dosis altas

(figura 10), sin diferencia estadísticamente significativa. Once pacientes desarrollaron enfermedad por CMV (26% del total de los infectados), sin diferencias significativas entre los grupos. La incidencia acumulada de infección por CMV se muestra en la figura 5.

Figura 5. Incidencia acumulada de infección por CMV.



5. Estudios de inmunofenotipo

5.1. Células dendríticas en sangre periférica.

En la tabla 6 se resumen los porcentajes y números absolutos de los diferentes subtipos de CDs en sangre periférica, tanto en las tres cohortes de pacientes como en un grupo control de individuos sanos. Tal como queda reflejado, no existen diferencias entre los tres grupos de pacientes sometidos trasplante independientemente de que reciban o no vitamina D, aunque sí se registraron diferencias significativas con los controles sanos, siendo el número de CDs

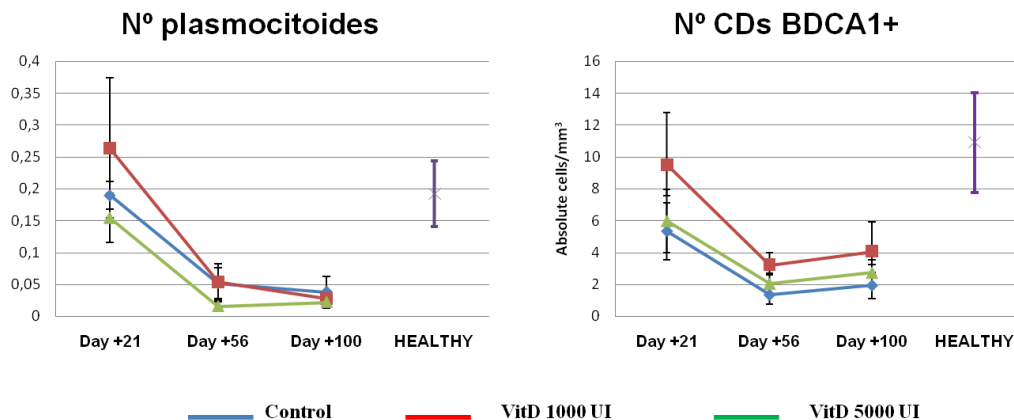
plasmocitoides y mieloides BDCA1+ significativamente más bajo en los pacientes en los días +56 y +100 postrasplante (Figura 6).

Tabla 6. Medias y error estándar de las poblaciones de CD

Media+/-SEM	SANOS	CONTROL	DOSIS BAJAS	DOSIS ALTAS
%Plasmocitoides	0,19+/-0,05			
<i>Día +21</i>		0,19+/-0,02	0,64+/-0,11	0,15+/-0,04
<i>Día +56</i>		0,05+/-0,02 [#]	0,05+/-0,03 [#]	0,02+/-0,01 [#]
<i>Día +100</i>		0,04+/-0,02 [#]	0,03+/-0,01 [#]	0,02+/-0,01 [#]
NºPlasmocitoide	11,28+/- 2,91			
<i>Día +21</i>		7,69+/-2,26	9,94+/-3,59	5,27+/-1,21
<i>Día +56</i>		1,31+/-0,43 [#]	1,56+/-0,61 [#]	0,86+/-0,38 [#]
<i>Día +100</i>		0,92+/-0,50 [#]	1,31+/-0,46 [#]	1,08+/-0,34 [#]
%BDCA1	0,19+/-0,06			
<i>Día +21</i>		0,13+/-0,03	0,26+/-0,10	0,16+/-0,05
<i>Día +56</i>		0,05+/-0,02	0,08+/-0,02	0,05+/-0,02 [#]
<i>Día +100</i>		0,05+/-0,02	0,07+/-0,02 [#]	0,06+/-0,02 [#]
NºBDCA1	10,91+/-3,13			
<i>Día +21</i>		5,33+/-1,80	9,52+/-3,25	5,97+/-1,97
<i>Día +56</i>		1,33+/-0,56 [#]	3,21+/-0,76 [#]	2,04+/-0,63 [#]
<i>Día +100</i>		1,92+/-0,80 [#]	4,08+/-1,83 [#]	2,73+/-0,82 [#]
%Monocitoides	0,88+/-0,16			
<i>Día +21</i>		1,10+/-0,26	1,39+/-0,46	1,99+/-0,75
<i>Día +56</i>		1,47+/-0,97	0,48+/-0,16	0,66+/-0,27
<i>Día +100</i>		0,75+/-0,44	0,51+/-0,17	0,78+/-0,28
NºMonocitoides	50,03+/-6,68			
<i>Día +21</i>		44,54+/-14,34	63,60+/-22,25	72,43+/-25,17
<i>Día +56</i>		31,16+/-17,74	21,91+/-7,13	33,78+/-13,17
<i>Día +100</i>		20,47+/-7,78	37,35+/-14,41	34,29+/-11,68

SEM: error estándar de la media [#]Diferencias significativas entre sanos y grupos de tratamiento (p<0.05).

Figura 6. Nº de células dendríticas plasmocitoides y mieloides BDCA1+



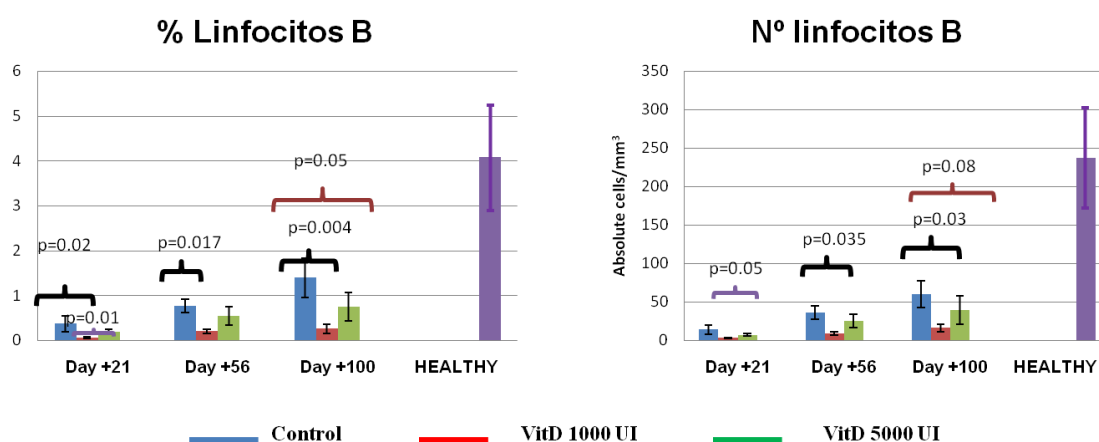
La expresión de CD86 como marcador de activación mostró diferencias significativas en el día +56 con una mediana de intensidad de fluorescencia significativamente más alta en las CD derivadas de monocitos de los pacientes del grupo de dosis bajas frente a los otros dos grupos.

5.2. Distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias

5.2.1. Linfocitos B y T

Con la combinación de anticuerpos seleccionada para determinar las subpoblaciones linfocitarias comprobamos que el efecto más evidente de la vitamina D sobre las diferentes poblaciones celulares se producía a nivel de los linfocitos B circulantes, que estaban significativamente disminuidos en los pacientes que recibían vitamina D frente al grupo control en el día +100 (tabla 6 y figura 7).

Figura 7. Número absoluto y porcentaje de linfocitos B



Por otro lado, los tres grupos mantenían un porcentaje y un número absoluto similar de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos T, linfocitos T CD4/CD8 y células NK, tal como se muestra en la tabla 7 (número absoluto) y tabla 8 (porcentaje).

Tabla 7. Número absoluto de poblaciones linfocitarias

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
Linfocitos	2203.09(471,40)			
<i>Día +21</i>		958.57(193.99) [#]	859.15(121.59) [#]	1013,19(135.87) [#]
<i>Día +56</i>		1004.99(243.09) [#]	1198.58(392.78)	805,14(221.96) [#]
<i>Día +100</i>		1259.35(267.91)	1584.95(502.14)	1087,55(267.48) [#]
Linfocitos T	1587.55+/-304,07			
<i>Día +21</i>		724,73+/-166,51 [#]	561,07+/-83,14 [#]	752,58+/-121,44 [#]
<i>Día +56</i>		832,01+/-236,23 [#]	993,34+/-378,99	610,34+/-183,02 [#]
<i>Día +100</i>		1028,17+/-224,17	1356,67+/-487,89	860,92+/-237,53 [#]
CD4+	963.98(220,50)			
<i>Día +21</i>		345.35(77,34) [#]	243.17(35,33) [#]	309.37(47,37) [#]
<i>Día +56</i>		278.75(53,28) [#]	223.12(39,38) [#]	244.60(59,31) [#]
<i>Día +100</i>		416.16(80,41) [#]	371.14(113,99) [#]	337.01(83,27) [#]
CD8+	499.74(64,81)			
<i>Día +21</i>		265.28(78.39)	276.65(65.32)	393.42(96,56)
<i>Día +56</i>		467.25(185.17)	670.52(338.09)	326.11(128,60)
<i>Día +100</i>		511.86(134.97)	847.62(371.55)	471.89(147,66)
CD4-CD8-	77.88(31,68)			
<i>Día +21</i>		102.70(32.35)	33.37(5.46)	41,66(6,15)
<i>Día +56</i>		81.00(29.14)	38.39(10.68)	28,94(7,12)
<i>Día +100</i>		92.58(21.05)	36.57(8.89)	38,27(8,05)
CD4+CD8+	45.89(15,96)			
<i>Día +21</i>		6,23(1,62) [#]	7,73(1,31) [#]	7,73(1,35) [#]
<i>Día +56</i>		4,75(1,47) [#]	12,52(5,16) [#]	10,79(4,69) [#]
<i>Día +100</i>		7,50(2,56) [#]	7,87(2,38) [#]	13,73(6,00) [#]
Células NK	378.28(112,41)			
<i>Día +21</i>		220,27(36,95)	273,48(43,34)	273,17(36,19)
<i>Día +56</i>		178,99(29,79)	208,89(40,69)	170,20(49,35)
<i>Día +100</i>		232,19(48,60)	212,17(53,55)	187,60(38,37)
Linfocitos B	237.12(64,94)			
<i>Día +21</i>		13,96(6,03)[#]	2,78(0,84)^{+#}	6,84(1,71)^{+#}
<i>Día +56</i>		35,98(8,18)^{*#}	8,89(2,15)^{*#}	24,83(8,55)[#]
<i>Día +100</i>		59,41(17,42)^{*#**}	16,06(4,93)^{*#}	39,12(18,48)^{#**}

[#]diferencias significativas entre grupos de tratamiento y sujetos sanos (p<0.05) *diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) [†]diferencias significativas entre CG y HdD (p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdD y HdD (p<0.05)

Por el contrario, el número de linfocitos T estaba significativamente disminuido en los pacientes en comparación con el grupo de sujetos sanos (tabla 6) en los diferentes momentos postrasplante. Del mismo modo, también estaban significativamente disminuidos en comparación con los sujetos sanos los linfocitos CD4+, CD4+CD8+ y los linfocitos B en los tres momentos evaluados postrasplante (+21, +56 y +100) (figura 8).

Figura 8. Número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD4+CD8+

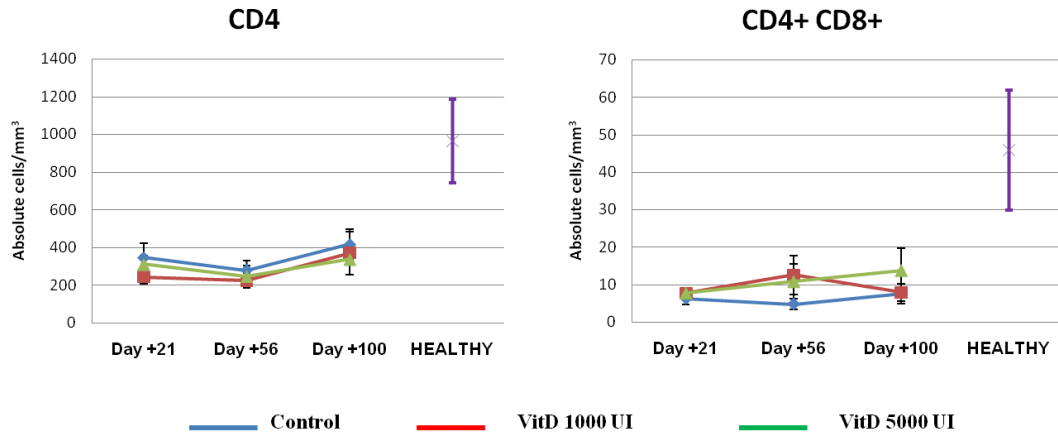


Tabla 8. Porcentajes de poblaciones linfocitarias

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
Linfocitos	37.75(8,35)			
<i>Día +21</i>		24,29(4,73)	21,89(3,03)	23,63(2,85)
<i>Día +56</i>		20,07(4,07)	22,85(5,45)	15,22(3,19) [#]
<i>Día +100</i>		23,87(3,72)	20,87(5,28)	21,21(4,11)
Linfocitos T	27.31(5,47)			
<i>Día +21</i>		19,18(4,24)	14,41(2,06) [#]	16,95(2,33)
<i>Día +56</i>		16,11(3,77)	18,67(5,32)	11,29(2,52) [#]
<i>Día +100</i>		19,43(3,21)	17,51(5,18)	16,75(3,66)
CD4+	59.53(2,63)			
<i>Día +21</i>		52,89(3,35)	46,84(6,08)	46,85(4,72)
<i>Día +56</i>		45,32(3,84)	36,82(6,60)	47,36(4,29)
<i>Día +100</i>		43,70(2,04) [#]	35,25(6,27)	42,29(3,50) [#]
CD8+	32.86(3,22)			
<i>Día +21</i>		32,98(2,98)	44,96(6,27)	45,17(5,32)
<i>Día +56</i>		43,45(3,54)	51,74(7,45)	45,31(4,89)
<i>Día +100</i>		45,39(2,35) [#]	54,35(7,48)	50,68(4,03) [#]
CD4-CD8-	4.56(1,00)			
<i>Día +21</i>		12,90(2,75)	6,35(1,02)	6,69(1,23)
<i>Día +56</i>		10,40(2,25)	5,51(1,39)	6,26(1,03)
<i>Día +100</i>		10,20(1,73)	3,99(0,87)	5,58(0,81)
CD4+CD8+	3.05(1,09)			
<i>Día +21</i>		0,90(0,16) [#]	1,83(0,53)	1,26(0,17)
<i>Día +56</i>		0,61(0,19) [#]	1,70(0,71)	1,34(0,29) [#]
<i>Día +100</i>		0,63(0,12) [#]	1,01(0,42)	1,44(0,26)
Células NK	6.36(1,89)			
<i>Día +21</i>		4,76(0,74)	6,92(1,14)	6,98(1,02)
<i>Día +56</i>		4,16(0,86)	4,14(0,83)	3,38(0,94)
<i>Día +100</i>		4,25(0,56)	3,10(0,86)	3,72(0,68)
Linfocitos B	4.07(1,17)			
<i>Día +21</i>		0,36(0,17) ^{#*}	0,06(0,02) ^{#*+}	0,18(0,05) ^{#+}
<i>Día +56</i>		0,77(0,15) ^{#*}	0,19(0,05) ^{#*}	0,54(0,20) [#]
<i>Día +100</i>		1,39(0,43) ^{#*}	0,25(0,11) ^{#*}	0,74(0,31) [#]

[#]diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) *diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) ⁺diferencias significativas entre CG y HdD(p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdD y HdD(p<0.05)

5.2.2. Linfocitos T naive/memoria/efector

De acuerdo con la expresión de CD45RA y CCR7 separamos cuatro grupos de linfocitos T tanto CD4 como CD8:

- Naive: CD45RA+ CCR7+
- Efector: CD45RA+ CCR7-
- Memoria central CD45RA-CCR7+
- Memoria periférica CD45RA-CCR7-

Como se objetiva en la *Figura 9*, los linfocitos T CD4+ naive estaban significativamente disminuidos en LdD, siendo mayor en este grupo el número de linfocitos CD4+ de memoria periférica.

En la tabla 9 se resume la distribución de los linfocitos T CD4 en los grupos de tratamiento así como en los sujetos sanos.

Tabla 9. Distribución de los linfocitos T CD4 naive/memoria/efector

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
CD4+ Naive	36.67(4,13)			
<i>Día +21</i>		21,85(2,87) [#]	15,64(2,98) [#]	27,11(5,75)
<i>Día +56</i>		21,49(2,99) [#]	17,32(4,49) [#]	22,27(5,48) [#]
<i>Día +100</i>		22,12(3,37) [*]	13,44(5,25) ^{##+}	23,55(4,26) ⁺
CD4+ Efector	1.78(1,20)			
<i>Día +21</i>		1,45(0,39)	1,18(0,64)	2,70(1,36)
<i>Día +56</i>		31,17(0,83)	4,33(1,99)	5,81(2,30)
<i>Día +100</i>		3,27(0,91)	4,43(1,65)	6,46(3,35)
CD4+ Memoria central	46.17(2,30)			
<i>Día +21</i>		46,20(2,73)	44,18(3,33)	42,65(4,17)
<i>Día +56</i>		45,92(2,09)	38,86(4,10)	37,40(4,44)
<i>Día +100</i>		46,31(2,15) [♦]	36,49(4,84)	36,00(4,04) [♦]
CD4+ Memoria periférica	15.38(2,54)			
<i>Día +21</i>		30,49(3,73) [#]	38,27(5,19) [#]	27,53(3,77)
<i>Día +56</i>		29,64(3,33) [#]	40,08(4,89) [#]	33,90(4,80)
<i>Día +100</i>		28,29(3,02) [♦]	45,74(5,81) [#]	33,98(4,11) ^{##♦}

[#]diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) ^{*}diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) [♦]diferencias significativas entre CG y HdD(p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdD y HdD(p<0.05)

Respecto a los linfocitos CD8+, destaca fundamentalmente un menor número de linfocitos CD8 naive en los grupos que reciben vitamina D frente al grupo control y una tendencia (en algunos casos significativa) a que este grupo presentara un menor número de de memoria periférica (Figura 10).

En la *tabla 10* se resume los porcentajes de estas poblaciones en los CD8 habiendo de nuevo diferencias en la distribución de éstos frente a la cohorte sana.

Tabla 10. Distribución de los linfocitos T CD8 naive/memoria/efector

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
CD8 Naive	23.68(6,01)			
<i>Día +21</i>		17,58(3,24)	8,96(2,28) [#]	13,40(1,83) [#]
<i>Día +56</i>		16,21(3,48) [*]	8,96(2,27) [*]	12,64(2,27)
<i>Día +100</i>		16,02(2,15) ^{*♦}	7,83(2,89) ^{#*}	9,63(1,81) ^{#♦}
CD8 Efector	36.40(7,95)			
<i>Día +21</i>		29,84(3,08)	25,90(4,27)	35,93(5,38)
<i>Día +56</i>		37,15(4,10)	38,10(4,42)	44,52(5,78)
<i>Día +100</i>		43,96(4,60)	42,92(6,62)	50,61(5,61)
CD8 Memoria central	11.67(1,89)			
<i>Día +21</i>		11,52(2,59)	9,99(2,38)	6,77(2,03)
<i>Día +56</i>		6,65(1,23)	7,12(1,77)	5,81(1,62)
<i>Día +100</i>		8,25(1,57)	8,00(3,60)	3,90(0,93) [#]
CD8 Memoria Periférica	28.25(1,30)			
<i>Día +21</i>		41,10(3,65) [*]	55,72(6,82) ^{#*}	43,89(6,03) [#]
<i>Día +56</i>		40,00(4,31) [#]	46,93(5,11) [#]	37,02(4,84)
<i>Día +100</i>		31,75(3,89)	39,15(3,36)	35,85(4,97)

[#]diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) ^{*}diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) [♦]diferencias significativas entre CG y HdD(p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdDy HdD (p<0.05)

Figura 9. Linfocitos CD4+ naive/efector/memoria

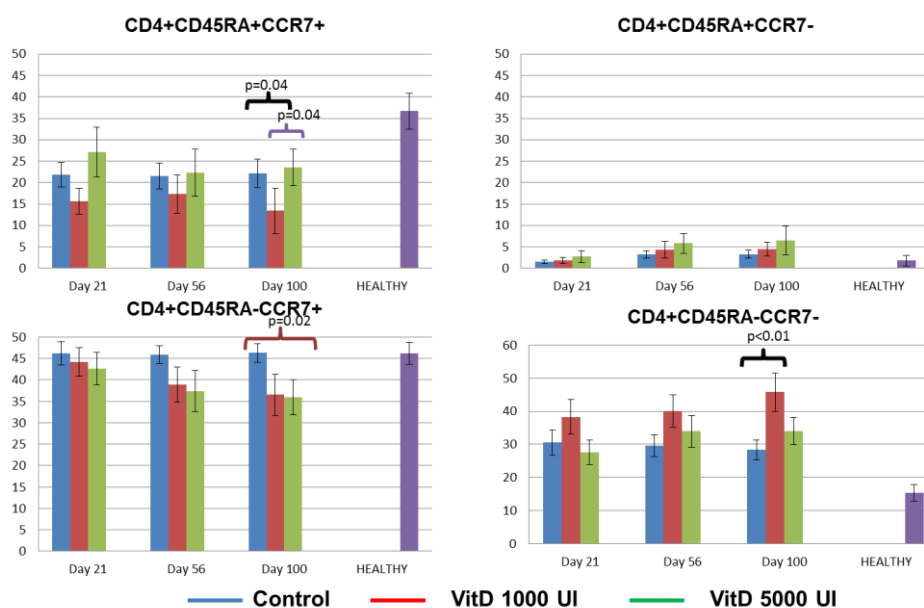
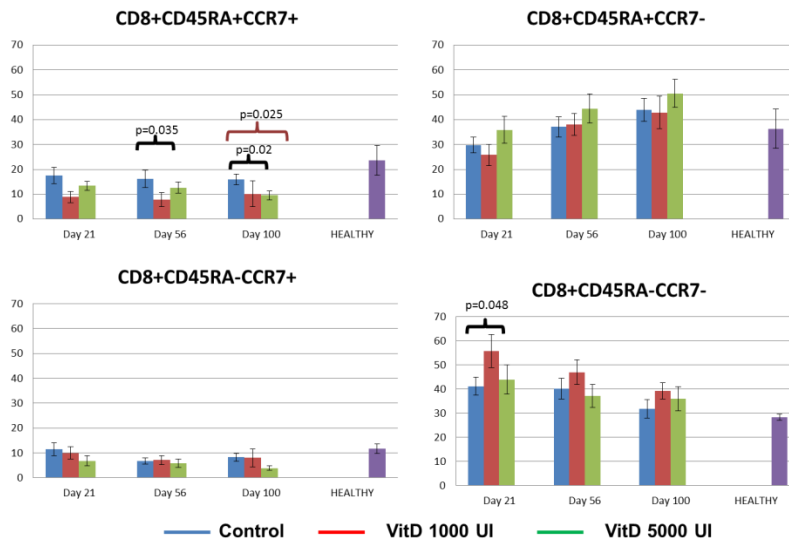


Figura 10. Linfocitos CD8+ naive/efector/memoria



5.2.3. Linfocitos T reguladores

La cantidad de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+/-dim Foxp3+) fue similar en el grupo control y el HdD mientras que estaba significativamente disminuida en el LdD (*Figura 11*). Curiosamente este grupo presentaba una cantidad de Treg similar a la observada de los sujetos sanos (*Tabla 11*).

Figura 11. Linfocitos T reguladores

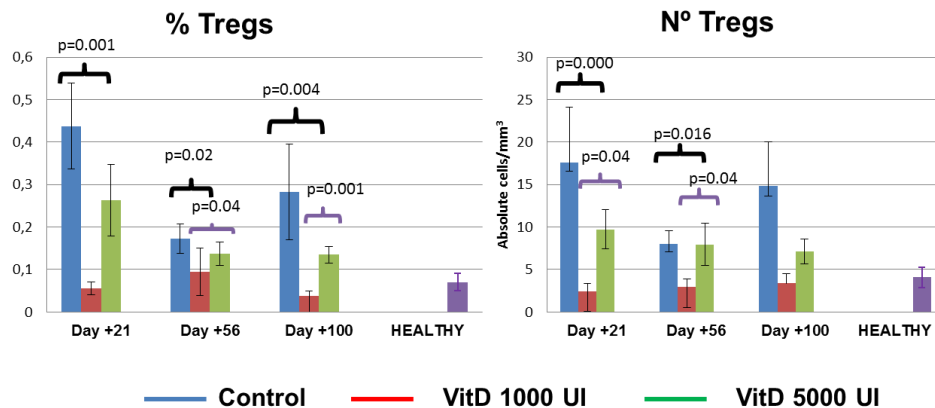


Tabla 11. Porcentaje y número de linfocitos T reguladores

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
Treg	0,07(0,02)			
<i>Día +21</i>		0,43(0,10) #*	0,05(0,01) *	0,026(0,08)
<i>Día +56</i>		0,17(0,03) *	0,09(0,05) * ⁺	0,14(0,03) ⁺
<i>Día +100</i>		0,28(0,11) *	0,03(0,01)* ⁺	0,13(0,02) ⁺
Treg Absoluto	4.05(1,16)			
<i>Día +21</i>		17,55(6,58) *	2,37(0,97) * ⁺	9,71(2,30) ⁺
<i>Día +56</i>		7,96(1,62) *	2,97(0,90) * ⁺	7,94(2,49) ⁺
<i>Día +100</i>		14,79(5,20) *	3,34(1,18) *	7,12(1,46)

#diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) *diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) ♦diferencias significativas entre CG y HdD(p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdDy HdD (p<0.05)

5.2.4. Células NK

No se observaron diferencias en los porcentajes ni en las cifras absolutas de células NK entre los tres grupos de tratamiento ni con respecto a los sujetos sanos. Sin embargo, se apreciaron diferencias entre los sujetos sanos y los tres grupos de pacientes en los que se refiere a las subpoblaciones de células NK CD56+ “bright” y “weak”, tal como se representa en la *tabla 12*; en este sentido, observamos un mayor porcentaje de células CD56 “bright” en los tres grupos de pacientes con respecto a los sujetos sanos.

Tabla 12. Subpoblaciones de células NK

Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
Células NK	6.36(1,89)			
<i>Día +21</i>		4,76(0,74)	6,92(1,14)	6,98(1,02)
<i>Día +56</i>		4,16(0,86)	4,14(0,83)	3,38(0,94)
<i>Día +100</i>		4,25(0,56)	3,10(0,86)	3,72(0,68)
Células NK Absoluto	378.28(112,41)			
<i>Día +21</i>		220,27(36,95)	273,48(43,34)	273,17(36,19)
<i>Día +56</i>		178,99(29,79)	208,89(40,69)	170,20(49,35)
<i>Día +100</i>		232,19(48,60)	212,17(53,55)	187,60(38,37)
Bright	5.35(1,23)			
<i>Día +21</i>		24,87(2,47) #	33,85(6,35) #	21,04(2,21) #
<i>Día +56</i>		21,60(2,63) #	17,36(3,79)	19,49(3,70)
<i>Día +100</i>		22,67(2,61) #	20,13(3,31) #	21,67(3,55) #
Weak	94.65(1,23)			
<i>Día +21</i>		75,13(2,47) #	66,15(6,35) #	78,83(2,21) #
<i>Día +56</i>		78,40(2,63) #	82,51(3,78)	80,51(3,70)
<i>Día +100</i>		77,32(2,61) #	79,83(3,32) #	78,33(3,55) #

#diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) *diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) ♦diferencias significativas entre CG y HdD(p<0.05) ⁺diferencias significativas entre LdDy HdD (p<0.05)

6. Activación linfocitaria

Centrando el análisis en la expresión de CD40L, se encontraron niveles disminuidos de CD40L en los grupos de vitamina D con respecto al control en el día +100 (*Figura 12*). También se encontraron diferencias en este marcador entre los sujetos sanos y las diferentes cohortes de tratamiento en los días +21, +56 y +100 postrasplante, con disminución del nivel de expresión tal como queda reflejado en la *tabla 13*.

En lo que se refiere a la expresión intracelular de interferón, no se observaron diferencias entre los tres grupos, aunque cuando comparábamos las cohortes de pacientes con los sujetos sanos los niveles de IFN estaban significativamente aumentados en el día +100 postrasplante (*tabla 13*).

Figura 12. IFN y CD40L intracitoplasmático

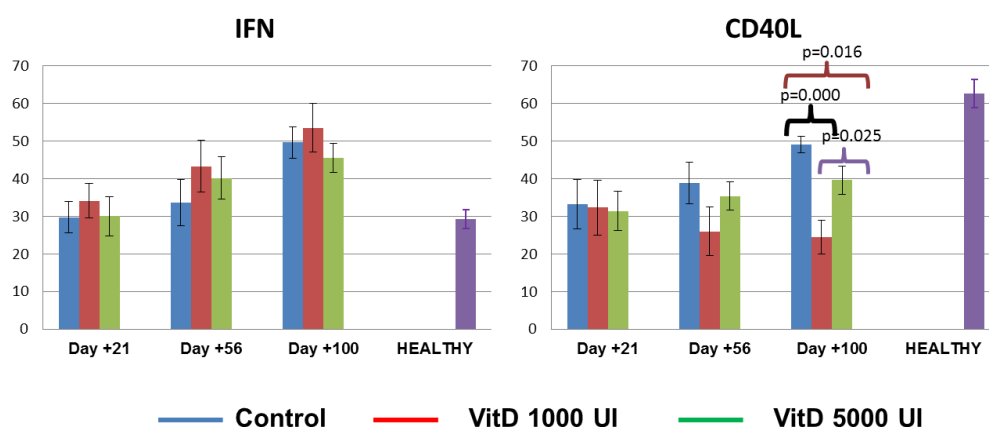


Tabla 13. Niveles de IFN y CD40L intracitoplasmático

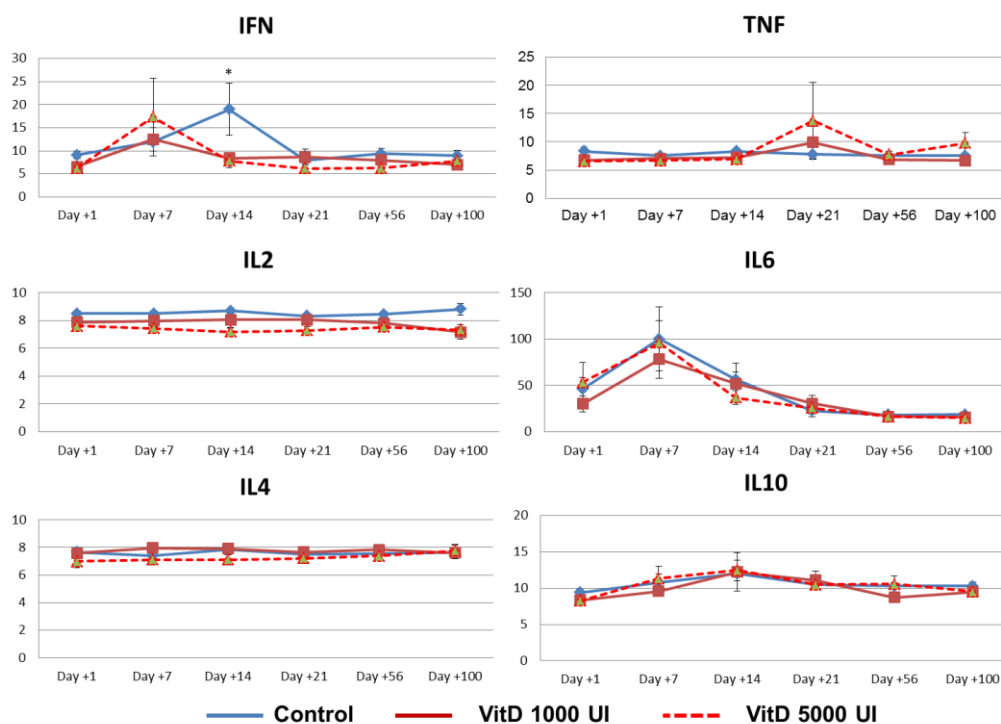
Media (SEM)	SANOS	CG	LdD	HdD
IFN	29.32(2,49)			
<i>Día +21</i>		29,70(4,19)	34,13(4,62)	30,00(5,19)
<i>Día +56</i>		33,66(6,16)	43,28(6,83)	40,12(5,62)
<i>Día +100</i>		49,59(4,21) [#]	53,47(6,49) [#]	45,54(3,93)
CD40L	62.55(3,77)			
<i>Día +21</i>		33,14(6,57) [#]	32,33(7,32)	31,42(5,24) [#]
<i>Día +56</i>		38,85(5,47) [#]	25,98(6,41) [#]	35,36(3,77) [#]
<i>Día +100</i>		49,09(2,13) ^{#*†}	24,46(4,53) ^{#*+}	39,58(3,67) ^{#**}

[#]diferencias significativas entre grupos de tratamiento y cohorte sana (p<0.05) ^{*}diferencias significativas entre GC y LdD (p<0.05) [†]diferencias significativas entre CG y HdD (p<0.05) ^{**}diferencias significativas entre LdD y HdD (p<0.05)

6. Citocinas en suero.

Con respecto a las citocinas en suero, los valores fueron similares en los distintos grupos de tratamiento y en los controles sanos, salvo IFN γ que presentó niveles más elevados en el grupo control (media 18,9) en el día +14 frente a los otros dos grupos, sin diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento (media LDvitD 8,4 y media HDvitD 7,7) (figura 13). Además, todos los pacientes incrementaban significativamente IL6 en los primeros 14 días del trasplante.

Figura 13. Citocinas en suero.



8. Niveles de vitamina D.

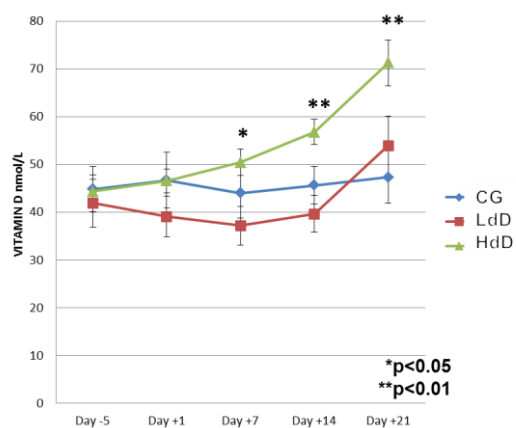
Respecto a los niveles plasmáticos de la 25-hidroxi-vitaminaD (*tabla 14*), es relevante señalar que antes de la administración de vitamina D en el día -5, los tres grupos presentaban niveles por debajo del límite inferior de la normalidad (rango nivel normal: 50-250 nmol/L). En cambio, los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D fueron significativamente superiores en los pacientes incluidos en HdD desde el día +7 postrasplante mientras que para el

grupo LdD se apreció un incremento en el límite de la significación estadística únicamente en el día +21. (Figura 14).

Tabla 14. Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D

<i>Media</i> +/- <i>ESM</i>	<i>CONTROL</i>	<i>LdD</i>	<i>HdD</i>
<i>(ng/ml)</i>			
<i>Día -5</i>	<i>44,8</i> +/- <i>4,7</i>	<i>41,9</i> +/- <i>4,9</i>	<i>44,3</i> +/- <i>3,5</i>
<i>Día +1</i>	<i>46,7</i> +/- <i>5,8</i>	<i>39,1</i> +/- <i>4,2</i>	<i>46,6</i> +/- <i>2,5</i>
<i>Día +7</i>	<i>44</i> +/- <i>5,2</i>	<i>37,2</i> +/- <i>4</i>	<i>50,4</i> +/- <i>2,8</i>
<i>Día +14</i>	<i>45,6</i> +/- <i>3,9</i>	<i>39,6</i> +/- <i>3,9</i>	<i>56,8</i> +/- <i>2,6</i>
<i>Día +21</i>	<i>47,3</i> +/- <i>5,5</i>	<i>53,9</i> +/- <i>6,1</i>	<i>71,3</i> +/- <i>4,8</i>

Figura 14. Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D

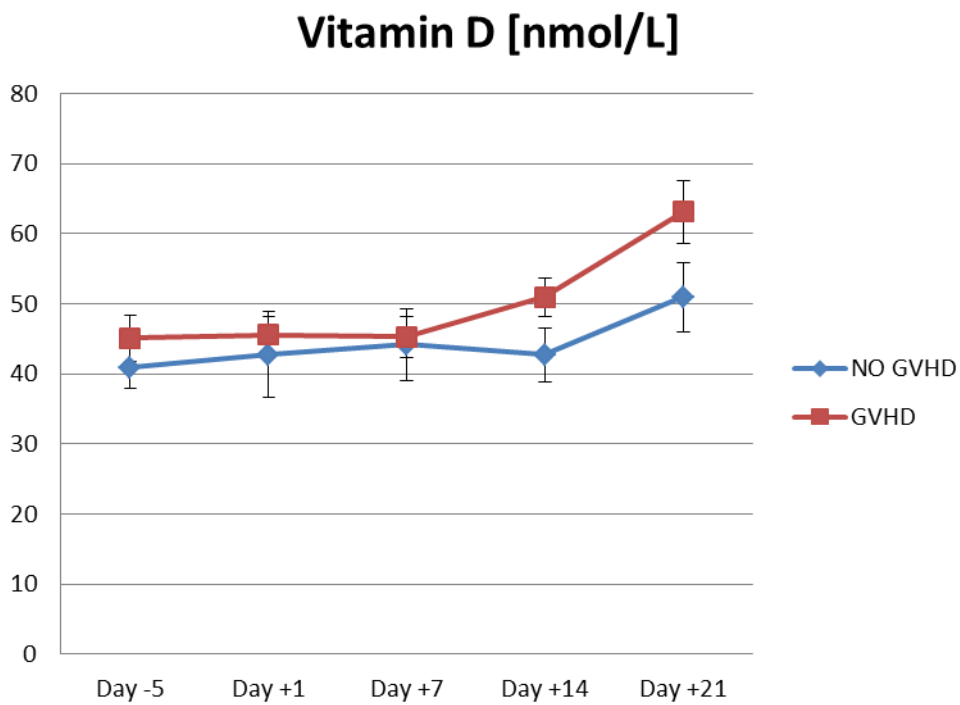


9. Análisis según desarrollo de EICH agudo

Dado el diseño del estudio y los momentos en los que se extrajeron las muestras biológicas, pudimos evaluar las variables biológicas en nuestros pacientes en función de la presencia o no de enfermedad injerto contra huésped aguda. En total 30 pacientes desarrollaron EICH aguda y 15 no la presentaron.

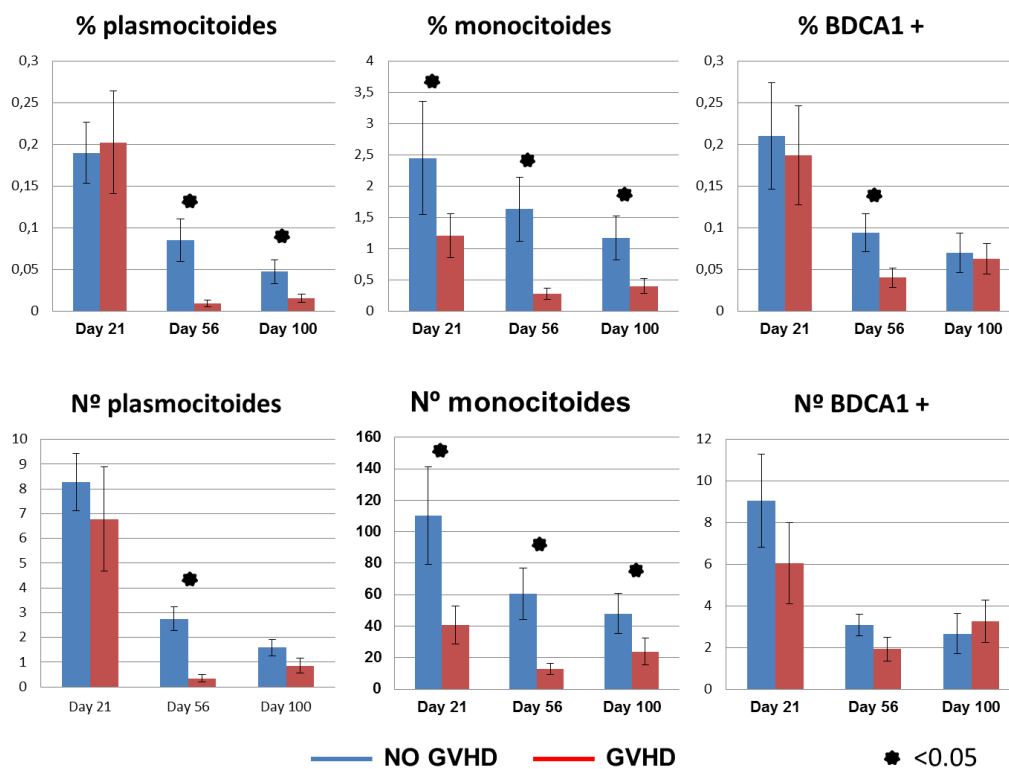
No encontramos diferencia en los niveles de vitamina D en plasma en los pacientes hubieran o no desarrollado EICH aguda tal como se refleja en la figura 15.

Figura 15. Niveles plasmáticos de vitamina D



Respecto a las CD destaca que los pacientes que desarrollaron EICH aguda presentaron menor porcentaje y número absoluto de células dendríticas monocitoides en los tres momentos estudiados (+21, +56 y +100) ($p < 0.05$). En el caso de las CD plasmocitoides se observaron diferencias en el porcentaje en el día +56 y +100 y en número exclusivamente en el día +56. Las CD BDCA1 no mostraban diferencias en número, con menor porcentaje en el +56 (Figura 16).

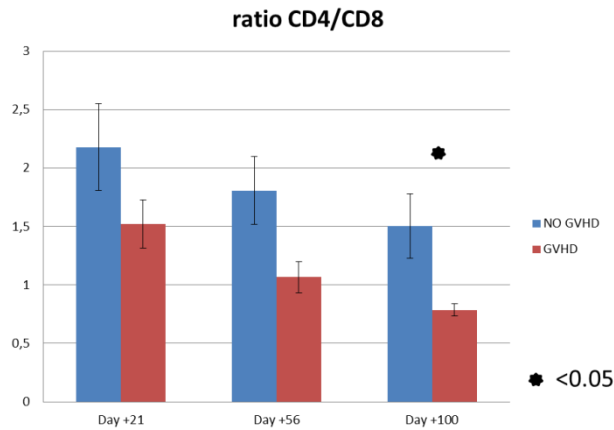
Figura 16. Subpoblaciones de células dendríticas.



No se encontraron diferencias en los leucocitos, linfocitos T, subpoblaciones CD4+ y CD8+, Treg, células NK ni subpoblaciones NK “bright/weak” entre los pacientes que desarrollaron EICH aguda frente a los que no, tal como se muestra en la tabla 14.

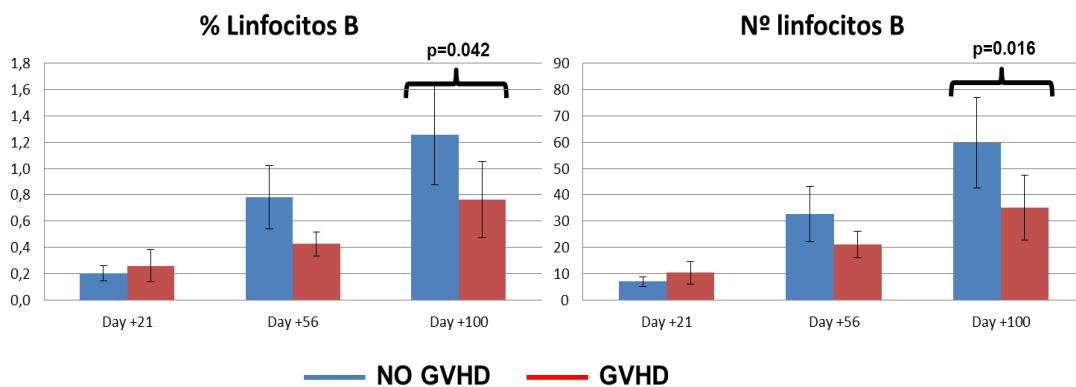
Aunque tampoco hubo diferencias en el porcentaje de CD4+ ni CD8+ si en el cociente CD4/CD8, siendo menor en los pacientes con EICH aguda en los días +56 ($p=0,052$) y +100 ($p=0,025$) (figura 17).

Figura 17. Ratio CD4/CD8 según la presencia de EICH aguda



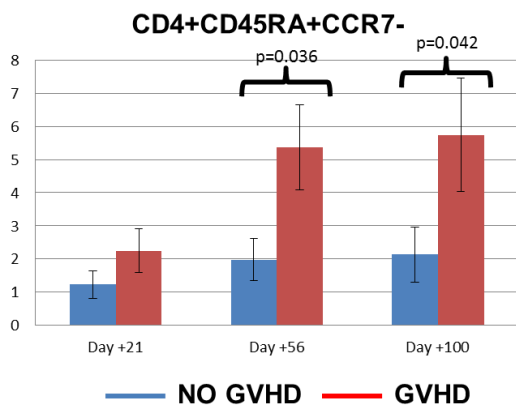
Además, los pacientes que desarrollaron EICH aguda presentaron menor porcentaje y número de linfocitos B en el día +100 ($p=0,016$). (figura 18)

Figura 18. Porcentaje y número de linfocitos B



En relación a la razón de linfocitos CD4 y CD8 naive/efectores/memoria únicamente se objetivaron diferencias en los linfocitos CD4 efectores siendo más altos en los pacientes que desarrollaron EICH aguda en el día +56 ($p=0,05$) y en el día +100 ($p=0,042$) (figura 19).

Figura 19. Linfocitos CD4+ efectores CD45RA+CCR7-



Con respecto a los parámetros de activación de linfocitos T, destaca fundamentalmente que en el día +100 se observaba mayor IFN intracitoplasmático en los pacientes con EICH aguda ($p=0.008$). Además éstos presentaron menor expresión de CD40L en el día +21 ($p=0.039$)(figura 20).

Figura 20. Activación linfocitaria.

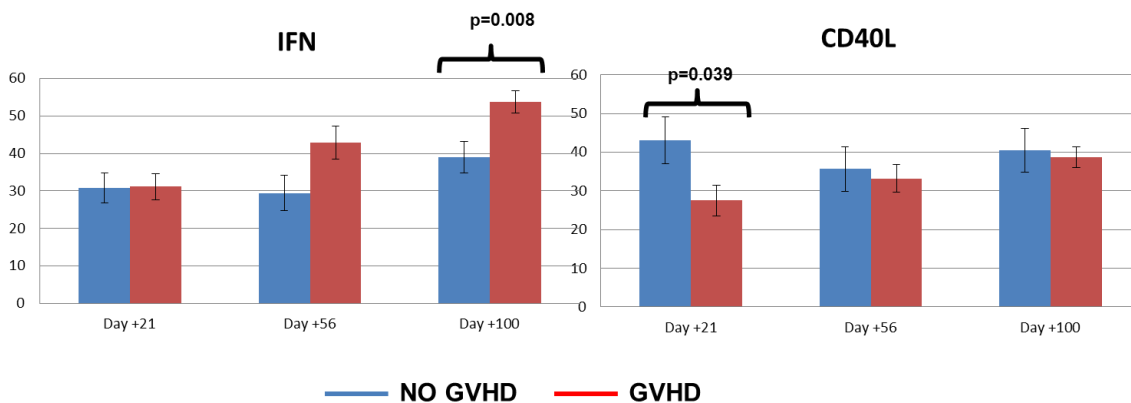


Tabla 14. Número absoluto de poblaciones (*diferencias significativas $p < 0,05$)

Poblaciones	EICH	Media(ESM)	Media(ESM)	Media(ESM)
		Día +21	Día +56	Día +100
Leucocitos	NO	4.473,33(639,79)	4.311,43(620,48)	6.672,31(1.125,7)
	SI	5.175,17(719,76)	5.387,33(431,63)	5.715,00(818,28)
Linfocitos	NO	821,68(170,75)	1.033,87(185,96)	1.399,99(336,57)
	SI	1.021,46(124,63)	945,58(214,00)	1.217,45(222,14)
Linfocitos T	NO	572,40(142,66)	719,97(150,12)	1.051,64(277,25)
	SI	760,54(107,95)	817,04(205,97)	1.045,85(208,94)
CD4+	NO	260,52(46,70)	291,95(51,58)	418,25(97,21)
	SI	336,63(53,78)	241,78(39,81)	362,04(60,18)
CD8+	NO	233,18(78,81)	333,22(100,30)	539,39(181,60)
	SI	347,67(62,10)	512,97(169,14)	591,29(144,34)
CD4-CD8-	NO	70,58(37,67)	86,42(39,89)	84,17(23,23)
	SI	65,94(13,82)	36,98(7,62)	51,82(11,20)
CD4+CD8+	NO	7,99(1,79)	8,35(1,92)	9,85(1,97)
	SI	6,56(1,00)	9,00(2,83)	9,49(3,32)
Cels NK	NO	260,72(43,33)	280,17(45,91)	288,64(62,50)
	SI	243,23(26,25)	137,44(20,36)	176,87(25,46)
CD56++	NO	27,45(2,80)	23,97(2,77)	25,46(2,77)
	SI	24,91(2,76)	18,14(2,35)	20,00(2,21)
CD56+	NO	72,55(2,80)	75,98(2,76)	74,54(2,77)
	SI	75,09(2,76)	81,83(2,35)	79,99(2,21)
Linfocitos B	NO	6,93(1,79)	32,58(10,56)	59,73(17,29)*
	SI	10,30(4,24)	21,10(4,95)	35,04(12,37)*
Treg	NO	7,31(1,27)	9,46(2,65)	11,19(2,87)
	SI	13,83(4,76)	5,36(0,98)	9,02(3,44)

Discusión

Desde su desarrollo hace más de 50 años, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se ha empleado con éxito en el tratamiento de un número creciente de pacientes con hemopatías malignas. A pesar de que las expectativas de supervivencia mejoran año tras año, el trasplante se sigue asociando a una nada despreciable morbi-mortalidad fruto de la respuesta aloinmune de los linfocitos del donante frente a órganos y tejidos sanos de receptor, que ocasiona la enfermedad injerto contra huésped aguda y crónica, como ya se ha descrito en la introducción del presente trabajo.

La vitamina D es una hormona implicada en el metabolismo óseo y en la homeostasis del calcio, que se sintetiza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol tras exposición a radiación ultravioleta y, posteriormente, es transportada al hígado donde se hidroxila en el carbono 25, transformándose en la forma mayoritaria circulante (25(OH) D3). En el riñón sufre una nueva hidroxilación siendo la 1,25(OH)₂ D3 la forma activa que se une al receptor VDR. Su efecto sobre el sistema inmune ha sido definido recientemente. VDR se expresa en células inmunes activadas tales como los macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B. La vitamina D inhibe la maduración de células dendríticas, bloquea la proliferación y reduce la activación de linfocitos T, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-2, e incrementa la producción de células T *reguladoras*.

A pesar de este papel activo en la regulación de la respuesta inmune, no se ha descrito ningún estudio prospectivo en el que se haya evaluado el papel inmunomodulador de la vitamina D tras el trasplante hematopoyético y no ha sido hasta fechas recientes que se han publicado los primeros trabajos analizando, de manera retrospectiva, el potencial impacto de los niveles de vitamina D pretrasplante en la evolución de los enfermos.

En este sentido, tal como describe Glotzbecker et al¹, los pacientes sometidos a trasplante tienen unos niveles de vitamina D significativamente más bajos (niveles medios de 21,9 ng/ml) que controles sanos (niveles normales 50-250 nm/L)^(2,3). Los autores asumen que las causas del déficit son multifactoriales y están relacionadas con el déficit de exposición a luz solar y, por tanto, a radiación ultravioleta así como con la alteración del metabolismo

de la vitamina D y de la hormona paratiroidea observada en pacientes críticos, tal como refieren Lee et al en su estudio sobre hipovitaminosis D en pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos ⁴ y Thomas et al en un trabajo previo sobre 164 pacientes hospitalizados ⁵. Además, recientemente se han descrito niveles disminuidos de vitamina D en pacientes oncológicos antes del inicio del tratamiento, con lo que se debate si este estado de insuficiencia de vitamina D podría incluso ser una causa predisponente al evento oncogénico o una consecuencia del mismo⁶. En cualquier caso, independientemente de aspectos geográficos, en el periodo postrasplante existen numerosas causas que favorecen la hipovitaminosis. Además de las ya mencionadas en los pacientes críticos, que también aplicarían al periodo postrasplante, no es despreciable el número de pacientes que presenta alteración de las pruebas de función hepática y/o insuficiencia renal leve, que también contribuirían a modificar el metabolismo de la vitamina D.

Tal como hemos referido, diversos estudios preclínicos sugieren que la vitamina D podría inhibir la expansión de células T aloreactivas y que su deficiencia podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de EICH tras el trasplante alogénico. En un modelo murino publicado en 2001 por Pakkala y colaboradores⁷, MC1288, un análogo de la vitamina D, disminuye el riesgo de EICH aguda administrado en monoterapia o asociado a CsA. En 2014, Ganetsky y colaboradores en la Universidad de Pensilvania, analizan 54 pacientes sometidos a TPH alogénico y describen que la deficiencia de vitamina D (<20 nmol/l) en el día +30 postTPH se asocia a mayor riesgo de EICH aguda cutánea grados II-IV⁸. Por el contrario, en 2014, Hansson y colaboradores describen, en un grupo de 123 niños sometidos a TPH alogénico en los que midieron niveles de vitamina D⁹, que aquéllos con niveles inferiores a 50 nmol/ml presentaban un riesgo inferior de EICH aguda en comparación con los pacientes que tenían niveles superiores.

Con estos antecedentes, nos propusimos analizar en el presente trabajo el efecto inmunomodulador de la vitamina D postrasplante. A pesar de que la mayoría de estudios describen que los niveles normales o elevados de vitamina D se correlacionan con un menor riesgo de EICH existe algún estudio, como se ha mencionado anteriormente, en el que se encuentra la relación contraria,

esto es, menor riesgo de EICH con menores niveles de vitamina D. Por otra parte, no se ha descrito previamente la dosis óptima para generar un efecto inmunomodulador. En este sentido, tal y como comunican Brum y colaboradores en una recopilación de ensayos clínicos sobre pacientes con esclerosis múltiple tratados con vitamina D¹⁰, niveles superiores a 40 nmol/ml ejercen una acción moduladora sobre células inmunes. Algunos estudios efectuados en países nórdicos¹¹ emplean dosis de vitamina D semanales de 20000 UI de colecalciferol mientras que en un ensayo australiano se compararon dosis de 6000 UI cada 12 horas frente a 1000 UI diarias¹², dosis esta última que es similar a la empleada en nuestro estudio en el grupo de vitamina D a bajas dosis.

Por tanto, en el momento de plantear el presente estudio, hay datos contradictorios acerca del efecto de la vitamina D empleada tras el trasplante y se desconoce la dosis y posología idóneas, todo lo cual nos condujo a diseñar un ensayo fase I/II de seguridad y eficacia empleando cohortes de pacientes que recibirían dosis crecientes de vitamina D de manera secuencial, dentro de un rango de dosis similar a lo descrito en estudios previos fuera del contexto del trasplante.

En base a nuestros propios resultados y los descritos en ensayos con vitamina D en pacientes con cáncer, tales como los recogidos en la página web del "National Cancer Institute"¹⁰, pensamos que 1000 UI / día son suficientes para normalizar niveles plasmáticos⁽¹³⁻¹⁷⁾. En este sentido, en el ensayo clínico más amplio llevado a cabo por Manson et al sobre 20000 individuos sanos que fueron suplementados con vitamina D más el ácido graso omega 3 con el objetivo de prevenir cáncer y riesgo cardiovascular, se emplearon dosis de vitamina D de 2000 UI, con una toxicidad asumible, aunque sus resultados aún continúan documentándose¹⁸. Una revisión de 2011 de Chung y colaboradores sobre los ensayos con vitamina D para prevención de cáncer y/o fracturas comunicó que posiblemente un incremento en los niveles de 10 nmol/ml es suficiente¹⁹.

Datos de seguridad:

¹⁰<http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/vitamin-d-fact-sheet#r12>

En nuestro estudio, la vitamina D a dosis de 1000 UI o 5000 UI al día ha resultado segura, con una toxicidad leve, fundamentalmente gastrointestinal, que ha motivado una tasa despreciable de abandono del tratamiento. No se ha observado ningún caso sugerente de intoxicación descrita tal como refieren Bell y colaboradores en su estudio sobre uso prolongado de vitamina D²⁰.

Finalmente, aunque no existe consenso sobre cuál es el nivel de vitamina D ideal en enfermedades de base inmune ni, por tanto, sobre qué dosis debe ser utilizada, dosis superiores o iguales a 10000 UI diarias se asocian en diferentes estudios a hipercalcemia⁽²¹⁻²³⁾. En nuestro estudio, las dosis utilizadas han sido suficientes para la exploración de los objetivos propuestos.

Vitamina D y riesgo de infecciones

Teniendo en cuenta que la vitamina D modifica la respuesta inmune postrasplante, una de los potenciales efectos secundarios podría relacionarse con el riesgo de infecciones. En nuestro estudio, pudimos recopilar datos sobre infección por CMV en 130 pacientes incluidos en nuestro centro tal como hemos referido anteriormente. Encontramos una tasa de infección por CMV superior en el grupo control (40%) con respecto a los dos grupos de tratamiento (28% en los pacientes que recibieron 1000 UI de vitamina D y 24% en el grupo de enfermos que recibió vitamina D a dosis de 5000 UI), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados son concordantes con los ya mencionados y publicados en 2015 por Von Bahr sobre una serie de 166 pacientes en los que los niveles descendidos de vitamina D se correlacionaban con una mayor frecuencia de enfermedad por CMV²⁴. Finalmente, otro estudio reciente realizado sobre 134 niños sometidos a trasplante, demuestra una supervivencia inferior en pacientes con déficit severo de vitamina D, si bien no encuentran diferencias en el riesgo de infección²⁵.

Existe una considerable cantidad de información en la literatura científica en torno al efecto de la vitamina D sobre las infecciones virales, alguna más antigua, como la recopilada por Yamshchikov y colaboradores en su revisión de 2010 sobre la posible influencia de esta hormona en la estacionalidad de infecciones como la gripe o las ocasionadas por rinovirus, y alguna más reciente y controvertida como las que relacionan la vitamina D con el pronóstico

de los pacientes infectados por VIH y con la reconstitución inmune tras el tratamiento antiretroviral⁽²⁶⁻²⁸⁾. Esta acción de la vitamina D podría relacionarse con su capacidad para regular la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como TNFalfa e IL-12 y péptidos antimicrobianos como la catelicidina y la beta defensina, proteínas antimicrobianas segregadas por diversas células incluidas las epiteliales, que forman parte de la inmunidad innata. Tal como refieren Cobo y Chadee en su revisión sobre el papel de las beta defensinas en la infección²⁹, la infección de los neutrófilos por CMV incrementa la expresión del ARN mensajero de la defensina LL37 que se potencia con la presencia del leucotrieno LTB4 tal como demostraron Gaubreault y colaboradores³⁰. La vitamina D promueve la secreción de LL37 y esto podría influir en el control de la infección viral³¹.

Efecto de la vitamina D sobre la respuesta inmune y la enfermedad injerto contra huésped:

Atendiendo a las variables biológicas relacionadas con EICH aguda, y teniendo en cuenta el efecto de la vitamina D sobre el sistema inmune, era esperable un descenso de la activación linfocitaria T ligada a la fase II de la EICH aguda y a los mecanismos efectores inflamatorios de la fase III, por ejemplo, inhibiendo la maduración de células dendríticas, la expresión de moléculas coestimuladoras, la respuesta Th1 secundaria y, por tanto, la aloreactividad mediada por células T.

Con respecto a las poblaciones leucocitarias, observamos un aumento de los linfocitos T CD8 de memoria periféricos en los dos grupos de tratamiento frente al grupo control en el día +21 y de linfocitos T CD4 y T CD8 de memoria periférico en el día +100. Tal como describen Zhang y colaboradores en 2004 y Zheng y colaboradores en 2008^(33,34), estas poblaciones no parecen asociarse a enfermedad injerto contra huésped aunque sí tienen un efecto injerto contra leucemia, si bien existe información contradictoria en la literatura. En este sentido, Zheng y colaboradores describen en 2009 que esta población sería capaz de generar enfermedad injerto contra huésped en un modelo de ratón³⁵. Es posible que este efecto se deba tanto a la acción directa de la vitamina D sobre las poblaciones linfocitarias que expresan VDR y que se diferencian en

sus diferentes subpoblaciones tras contacto con aloantígenos como a una interferencia sobre el tráfico linfocitario condicionado por quimocinas a través de regulación local tisular T ejercida por células dendríticas, tal como sugerían Sigmundsdottir y colaboradores en 2007³⁶.

Los patrones de activación de células T, la expresión de moléculas coestimuladoras, el análisis de las células T reguladoras y los niveles de citoquinas no arrojaron resultados significativos, al igual que aconteció en el estudio de Hansson y colaboradores²⁸. De hecho, de manera sorprendente, los pacientes que reciben vitamina D presentan unos niveles significativamente más bajos de linfocitos T reguladores que los observados en el grupo control. Es importante señalar que diversos estudios describen, por un lado, que los linfocitos T reguladores no son una población celular homogénea, y por tanto se requieren más estudios que analicen el efecto de la vitamina D sobre las diferentes subpoblaciones y, más importante, además de su cuantificación, es relevante evaluar su nivel de activación y su capacidad funcional.⁽³⁷⁻³⁹⁾

Es posible que la ineficacia de la vitamina D observada en nuestro estudio en la prevención de la enfermedad injerto contra huésped aguda pueda deberse al momento de inicio de su administración, ya que no es hasta las 3 semanas postrasplante cuando se aprecian diferencias en los niveles séricos entre los distintos grupos de pacientes. Por otra parte, la expresión de VDR en las fases iniciales de regeneración del tejido hematopoyético podría estar condicionada por la administración exógena de colecalciferol que interferiría así en el sistema autocrino/paracrino de la vitamina D presente en las células inmunes. Ya en 1990, Goff y colaboradores publicaron un estudio empleando un modelo murino en el que demostraban una disminución de VDR en las células renales tras administración de vitamina D como una forma de regulación⁴⁰. En este sentido, sería posible que la administración exógena de la hormona influyera en la expresión de VDR en linfocitos T⁴¹.

En nuestro estudio, los pacientes que recibieron vitamina D presentaron menor riesgo de EICH crónica. Curiosamente, disminuyó el riesgo de EICH crónica incluso en pacientes con elevado riesgo de desarrollarla, como son aquellos que han presentado previamente EICH aguda, lo que podría

justificarse por el efecto sinérgico entre esteroides y vitamina D. Ya Jirapongsananuruk y colaboradores demuestran en un estudio sobre muestras de 16 sujetos sanos como el empleo de dexametasona junto con 1,25 (OH)₂D₃ intensifica el efecto inmunosupresor de los corticoides vía Th1 bloqueando el efecto inhibitorio de la vía Th2 que queda de esta forma liberada⁴². En una revisión publicada en el año 2014 sobre vitamina D y hormonas esteroideas, Cutolo y colaboradores corroboran estos resultados⁴³.

Todo ello viene a confirmar nuestra hipótesis de trabajo y completan estudios exploratorios retrospectivos como los llevados a cabo por Glotzbecker y colaboradores que, sobre una serie de 53 pacientes, comprobaron que aquéllos con bajos niveles de vitamina D, en su caso inferiores a 25 nM/mL, presentaban mayor riesgo de desarrollar EICH crónica¹. Recientemente, Von Bahr y colaboradores han comunicado también, sobre una serie de 166 pacientes, que los niveles vitamina D inferiores a 42 nmol/mL también se asocian a mayor riesgo de padecer EICH crónica²⁴. Ya Silva y colaboradores sugirieron el potencial efecto beneficioso de la vitamina D en un grupo de 12 pacientes que recibieron vitamina D a dosis de 1000 UI más carbonato cálcico como tratamiento de la osteopenia tras el trasplante, objetivándose una mejoría de la EICH crónica sin efectos secundarios valorables⁴⁴.

En nuestro estudio la administración de 1000 UI o 5000 UI diarias de vitamina D en los primeros 100 días postrasplante disminuye el riesgo de desarrollar EICH crónica sin afectar el de EICH aguda, lo que pone de manifiesto la diferencia fisiopatológica entre ambas entidades. En la primera, existe un potente componente inflamatorio mientras que en la segunda predominan los fenómenos autoinmunes y la fibrosis. Se describe que en la EICH aguda predomina la respuesta Th1/Th17, mientras que en la EICH crónica la vía Th2 es preponderante, si bien hay controversia sobre esta cuestión. Tal como sugiere Toubai en su revisión sobre la fisiopatología de la EICH⁴⁵, el paradigma Th1/Th2 de las células T del donante en las formas aguda y crónica ha evolucionado. Datos experimentales muestran que cantidades adecuadas y fisiológicas de citoquinas Th1 son críticas para la inducción de la EICH, mientras que una producción alterada (baja o alta) podría inhibirla. Igualmente, la polarización Th2 en algunos modelos reduce la EICH

mientras que en otros estudios no puede probarse beneficio alguno. En lo que se refiere a la EICH crónica, un estudio reciente de Hayashida y colaboradores sobre biopsias de mucosa oral y de glándulas salivares de 16 pacientes con EICH crónica⁴⁶, sugiere que la EICH crónica podría iniciarse y mantenerse por células Th1, progresando posteriormente con la acumulación de células Th2 a través de la interacción con quimoquinas y receptores de quimoquinas. La subpoblación Th17 parece jugar también un papel importante en la EICH crónica, tal como muestra el trabajo de Nishimori de 2011 sobre un modelo de EICH crónica de ratón⁴⁷. En 2014, Brüggén y colaboradores ponen también énfasis en los diferentes mecanismos que separan la EICH aguda de la EICH crónica a partir de su estudio sobre biopsias cutáneas en pacientes con EICH, mostrando una predominancia de citoquinas Th2 y un incremento en la producción de IL-22 por células T CD4 en pacientes con EICH aguda y un patrón Th1/Th17 en la EICH crónica, con elevadas cantidades de interferón gamma y de IL-17 producidas por células CD8⁴⁸.

Debe destacarse también el papel crucial que la alteración de la función tímica juega en el desarrollo de la EICH. Mediante el proceso de selección negativa, en condiciones fisiológicas, las células autorreactivas son eliminadas, generando lo que se denomina "tolerancia central" mediante un proceso de delección clonal en el que intervienen células dendríticas tímicas. La selección positiva se lleva a cabo mediante el epitelio cortical tímico. En la EICH aguda, las células T maduras del donante se expanden de un modo independiente del timo y son responsables del inicio de la enfermedad. Sin embargo, en una fase más tardía, los linfocitos T generados de novo a partir de las células madres del donante, deberían sufrir el proceso fisiológico de selección negativa en el timo. Sin embargo, la selección negativa está alterada en pacientes con EICH crónica, como mostraron Sakoda y colaboradores, favoreciendo la emergencia de clones T autorreactivos que causan EICH crónica incluso en presencia de células T reguladoras⁴⁹.

Recuperación inmune postrasplante y EICH aguda.

Además, en el presente estudio pudimos constatar algunas diferencias llamativas en la recuperación de la respuesta inmune postrasplante en función

del desarrollo de EICH o no. Así, las células dendríticas plasmacitoides estaban disminuidas en sangre periférica en pacientes con EICH aguda en el día +56 en comparación con aquellos que no desarrollaron EICH aguda. Del mismo modo, las células dendríticas monocitoides también estaban disminuidas en los pacientes que desarrollaron EICH en los días +21, +56 y +100. Tal como hemos mencionado anteriormente, las células dendríticas plasmacitoides están relacionadas con la tolerancia. Podría ser coherente, por tanto, que se objetivara un menor número de las mismas en paciente con EICH aguda. Recientemente, Peric y colaboradores, en una serie de 79 pacientes, describen un descenso en la cifra de células dendríticas en el día +100 con una peor supervivencia y un mayor riesgo de EICH aguda severa⁵⁰.

En cuanto a las poblaciones linfocitarias T, encontramos en nuestro estudio una ratio CD4/CD8 significativamente descendida en los pacientes con EICH aguda en los días +56 y +100. Estos resultados son difíciles de interpretar teniendo en cuenta que son pacientes que reciben tratamiento esteroideo, lo que podría influir en dicha ratio. Más concordante con lo descrito en la literatura es el hallazgo de un incremento en los linfocitos CD4 efectores vírgenes (CD45RA+CCR7-) en los enfermos con EICH aguda en los días +56 y +100 postrasplante. En 2014, Podgorny y colaboradores realizaron un análisis sobre subpoblaciones celulares en 216 pacientes sometidos a TPH alogénico llegando a esta misma conclusión aunque también demostraron un incremento en las poblaciones CD4 y CD8 de memoria que comienzan a disminuir conforme nos acercamos al día +100⁵¹. La molécula CD45, una fosfatasa-tirosina que regula la señalización a través del receptor de antígenos y el receptor de ciertas citocinas, se diferencia entre las células T vírgenes y memoria por su forma más que por su nivel de expresión. Existen múltiples isoformas identificadas que se generan por un procesamiento diferencial o "splicing" de tres exones extracelulares (A, B y C). Las células T vírgenes expresan las isoformas con los más altos pesos moleculares (comúnmente referidas como CD45RA en humanos). Durante el curso de la activación, los linfocitos T cambian la expresión de CD45 a bajos pesos moleculares (definido como CD45RO). Ya en el año 2004, Xystrakis y colaboradores demostraron en un modelo animal que sólo las poblaciones CD4 CD45RA efectoras eran

capaces de generar aloestimulación tras el trasplante ⁵². Este incremento de linfocitos CD4 efectoros vírgenes que observamos en periodos más tardíos con respecto a la infusión en pacientes con EICH aguda resulta difícil de interpretar teniendo en cuenta que la nueva linfopoyesis tímica procedente del donante se origina a partir de los tres meses del trasplante y pone de manifiesto que probablemente esta población efectora proceda de la proliferación de los linfocitos T del donante vírgenes inicialmente infundidos. Otra posible explicación sería reversión del fenotipo de memoria a vírgen ante la persistencia del antígeno ⁵³, considerando que en nuestro caso este antígeno podría estar representado por los péptidos pertenecientes al sistema menor de histocompatibilidad .

Los linfocitos B se encuentran descendidos en nuestro estudio en el día +100 en los pacientes con EICH aguda. Tal como describen Sánchez-García y colaboradores en su análisis de la linfopoyesis normal y patológica a partir de muestras de 39 pacientes con leucemia aguda linfoblástica B sometidos a aloTPH, la EICH aguda se asocia con una marcada inhibición de los precursores normales pro-B y pre-B en los días +30 y +60 ⁵⁴. Aunque no puede descartarse que esto sea debido al propio tratamiento de la EICH, las células T del donante pueden contribuir a esta inmunodeficiencia B mediante citotoxicidad mediada a través del ligando Fas o mediante liberación de citoquinas tales como interferón-gamma, que inhibe la linfopoyesis B. Este descenso de linfocitos B probablemente sea más que una consecuencia de la enfermedad injerto contra huésped ya que las células B juegan un papel fundamental en las respuestas fisiológicas inmunes y, en el contexto del trasplante, tras la activación del receptor BCR y de moléculas coestimuladoras como CD40, los linfocitos B constituyen potentes células presentadoras de antígenos, que estimulan a las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8. Por otro lado, algunas subpoblaciones B pueden ejercer funciones inmunomoduladoras, manteniendo la tolerancia periférica CD4 y CD8 mediante mecanismos como la delección, inducción de anergia y supresión mediada por citoquinas tal como se ha demostrado en algunos trabajos ⁵⁵⁻⁵⁷.

En cuanto a las células NK, existe un descenso de las mismas en el día +56 en los pacientes con EICH aguda. Este dato es concordante con lo publicado en la

literatura; Yim y colaboradores, en un estudio publicado en 2013 sobre 59 pacientes pediátricos sometidos a TPH alogénico⁵⁸, demostraron que la EICH aguda retrasaba la reconstitución de las células NK, siendo este dato corroborado en 2014 por Kheav especialmente en la población CD56 débil⁵⁹. Las células NK constituyen la primera población linfocitaria que se reconstituye después del TPH alogénico, con una primera expansión de la subpoblación CD56 brillante productora de citoquinas, seguida de la proliferación de una subpoblación intermedia CD56 brillante CD16 débil para pasar al desarrollo de la subpoblación dominante CD56 débil caracterizada por su mayor actividad citotóxica. El descenso que objetivamos de la población global en pacientes con EICH aguda podría también estar relacionado con el tratamiento esteroideo o ser una consecuencia de la EICH. La expresión de algunos ligandos de las células NK como NKG2 importantes para la respuesta antitumorales y antivirales de estas células así como para la activación de las mismas y que contribuyen al reconocimiento se inhiben tras la exposición a determinadas citoquinas como las liberadas durante la EICH aguda y esto podría contribuir al bloqueo de esta población^{60, 61}. Todo ello podría perpetuar la EICH ya que las células NK disminuyen la activación de los linfocitos T por las células presentadoras de antígenos destruyendo directamente estas células.

Resulta más probable que la disminución de la expresión de CD40L que observamos en los linfocitos T de nuestros pacientes esté más relacionada con el tratamiento de estos enfermos que con los mecanismos de regulación de esta molécula⁶².

Conclusiones

1.- La administración de vitamina D a dosis de 1000 UI y 5000 UI en pacientes sometidos a aloTPH es segura y permite incrementar sus niveles en sangre a partir de los 21 días postrasplante.

2.- La administración de vitamina D postrasplante disminuye el riesgo de EICH crónica así como la severidad de la misma, aunque no presenta impacto sobre la forma aguda de la enfermedad. El efecto observado con la dosis de 1000 UI diarias es similar al que se objetiva con la de 5000 UI.

3.- Nuestros datos biológicos, aunque limitados, nos hacen suponer que este efecto se deba a una estimulación Th2 inicial y a una supresión Th1 más tardía. Las modificaciones que se observan en los grupos que recibe vitamina D frente al que no la recibe se resumirían del siguiente modo: disminución de linfocitos B circulantes, reducción de linfocitos T CD4 y CD8 "naive" e incremento de efectores memoria, disminución de la expresión de CD40 L en linfocitos activados, y descenso de los niveles de IFN.

4.- Los pacientes en tratamiento con vitamina D tienen un menor riesgo de infección por CMV, con una tasa de infección del 28,8% y 24,3% en los pacientes que recibieron vitamina D 1000 UI y 5000 UI respectivamente, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

5.- Los pacientes en tratamiento con vitamina D tienen un menor riesgo de infección por CMV, con una tasa de infección del 28,8% y 24,3% en los pacientes que recibieron vitamina D 1000 UI y 5000 UI respectivamente frente al 40% del grupo control, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

6.- El subanálisis de los datos biológicos de los pacientes con EICH aguda es coherente con los datos publicados y confirma hallazgos recientes sobre la fisiopatología de esta enfermedad como el valor de los recuentos de células dendríticas en sangre periférica como parámetro predictivo, aunque se requieren estudios más amplios para profundizar en este aspecto.

Bibliografía

1. Introducción.

1. Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs.-host disease. En Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd ed. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR editores. Blackwell Publishing, USA, pp 353, 2004.
2. Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003;17:187–94.
3. Hofmeister CC, Quinn A, Cooke KR et al. Graft versus host disease of the skin: life and death on the epithelial edge. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004 10: 366.
4. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft versus host disease: rationale for the use of cytokines shileds in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000 95: 275 4.
5. Falkenbur JH, Corput L, Marijt WA et al. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003 31: 743.
6. Korngold R, Sprent J. Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex. *J Exp Med* 1980;151:1114–24.
7. Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 2005;106:1113–22.
8. Shlomchik WD. Antigen presentation in graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2003;31:1187–97.
9. Lechler R, Ng WF, Steinman RM. Dendritic cells in transplantation—friend or foe? *Immunity* 2001;14:357– 68.

10. Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 1996;13:221–9.
11. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, et al. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005;105:2227–34.
12. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003;192:161– 80.
13. Werlen G, Palmer E. The TCR signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Op Immunol* 2002 14: 299.
14. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113:273-278.
15. Anderson BE, McNiff J, Yan J, et al. Memory CD4 T cells do not induce graft-versus- host disease. *J Clin Invest* 2003;112:101– 8.
16. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, et al. Transfer of allogeneic CD62L-memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood* 2004 ;103:1534–41.
17. Zhang Y, Joe G, Zhu J, et al. Dendritic cell-activated CD44^{hi}CD8 T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity. *Blood* 2004;103:3970–8.
18. Maeda Y, Tawara I, Teshima T, et al. Lymphopenia-induced proliferation of donor T cells reduces their capacity for causing acute graft-versus-host disease. *Exp Hematol* 2007;35:274–86.
19. Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, et al. L-Selectin^(hi) but not the Lselectin^(lo) CD4²⁵ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004;104:3804 –12.

20. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, et al. Only the CD62L subpopulation of CD4 CD25 regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005;105:2220–6.
21. Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* 2004;10:87–92.
22. Chan WK, D'Suvarnasena D, Throm RE, et al. Chimeric antigen receptor-redirected CD45RA-negative T cells have potent antileukemia and pathogen memory response without graft-versus-host activity. *Leukemia* 2015; 29: 387-395.
23. Blazar BR, Taylor PA. Regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:46 –9.
24. Cohen JL, Boyer O. The role of CD4 CD25 regulatory T cells in the physiopathology of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol* 2006;18: 580 –5.
25. Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL. CD25 immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:525–35.
26. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, et al. Donor-type CD4 CD25 regulatory T cells suppress lethal transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389 –99.
27. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, et al. CD4 CD25 immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196:401– 6.
28. Roncarolo MG. The role of interleukin-10 in transplantation and GVHD. In Ferrara JLM, Deeg HJ, Burakoff SJ, eds. *Graft -vs- host disease*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997:693–715.
29. Young KJ, Du Temple B, Phillips MJ, et al. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:134–41.

30. Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, et al. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1 T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J Exp Med* 1999;189:1073–81.
31. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005;353:1321–31.
32. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4 CD25 regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9: 1144–50.
33. Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007;109:2649 –56.
34. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104:2187–93.
35. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903–11.
36. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, Van Kaer L, Tanimoto M, et al. Host NKT cells promote Th2 polarization of donor T cells and regulate acute GVHD after experimental BMT via a STAT6-dependent mechanism. *Blood* 2003;102: 191a.
37. Morris ES, MacDonald KP, Hill GR. Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? *Blood* 2006;107:3430 –5.

38. Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* 2003;21:149–61.
39. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4₊CD25₊ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; 108:390 –9.
40. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4₊CD25₊ regulatory T cells. *Nat Med*2005;11:1238–4.3
41. Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:176–85.
42. Ferrara JLM. The cytokine storm of acute graft-versus host disease. *Haematol Rev* 1994;8:27.
43. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771–5.
44. Reddy P. Interleukin-18: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2004;11:405–10.
45. Sykes M, Harty MW, Szot GL, Pearson DA. Interleukin-2 inhibits graft-versus-host disease-promoting activity of CD4 cells while preserving CD4- and CD8-mediated graft-versus-leukemia effects. *Blood* 1994;83:2560 –9.
46. Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA. Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86: 2429–38.

47. Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K, et al. Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J Exp Med* 2001;194:1433–40.
48. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994;84:3540–9.
49. Krenger W, Snyder KM, Byon CH, Falzarano G, Ferrara JLM. Polarized type 2 alloreactive CD4 and CD8 donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 1995;155:585–93.
50. Pan L, Delmonte J, Jalonon C, Ferrara J. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T-lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:4422–9.
51. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Keith JC Jr, Brinson YS, et al. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998;102:115–23.
52. Reddy P, Teshima T, Hildebrandt G, Williams DL, Liu C, Cooke KR, et al. Pretreatment of donors with interleukin-18 attenuates acute graft-versus-host disease via STAT6 and preserves graft-versus-leukemia effects. *Blood* 2003;101:2877–85.
53. Foley JE, Jung U, Miera A, Borenstein T, Mariotti J, Eckhaus M, et al. Ex vivo rapamycin generates donor Th2 cells that potently inhibit graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects via an IL-4-dependent mechanism. *J Immunol* 2005;175:5732–43.

54. Jung U, Foley JE, Erdmann AA, Toda Y, Borenstein T, Mariotti J, Fowler DH. Ex vivo rapamycin generates Th1/Tc1 or Th2/ Tc2 effector T cells with enhanced in vivo function and differential sensitivity to post-transplant rapamycin therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:905–18.
55. Fowler DH, Gress RE. Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000;38:221–34.
56. Nikolic B, Lee S, Bronson R, Grusby M, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct endorgan targets. *J Clin Invest* 2000;105:1289 –98.
57. Blazar BR, Taylor PA, Smith S, Vallera DA. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. *Blood* 1995;85:842–51.
58. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, Rowe V, Kuns R, Don A, et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005;106:2206 –14.
59. Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ, Kappel BJ, Perales MA, Rotolo JA, et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 2001;98:2256–65.
60. Alpdogan O, Muriglan SJ, Eng JM, Willis LM, Greenberg AS, Kappel BJ, et al. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2003;112:1095–107.
61. Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100: 2642–9.

62. Gendelman M, Hecht T, Logan B, Vodanovic-Jankovic S, Komorowski R, Drobyski WR. Host conditioning is a primary determinant in modulating the effect of IL-7 on murine graft-versus-host disease. *J Immunol* 2004;172:3328 – 36.
63. Weaver CT, Murphy KM. T-cell subsets: the more the merrier. *Curr Biol* 2007;17:R61–3.
64. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4191–9.
65. Mapara MY, Leng C, Kim YM, Bronson R, Lokshin A, Luster A, et al. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:623–34.
66. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, et al. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol* 2003;31:897–902.
67. Wysocki CA, Burkett SB, Panoskaltsis-Mortari A, Kirby SL, Luster AD, McKinnon K, et al. Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J Immunol* 2004;173:845–54.
68. Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, et al. Active participation of CCR5CD8 T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease.
69. Waldman E, Lu SX, Hubbard VM, Kochman AA, Eng JM, Terwey TH, et al. Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 2006;107:1703–11.

70. Welniak LA, Kuprash DV, Tumanov AV, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Sun K, et al. Peyer's patches are not required for acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and murine allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2006;107:410–2.
71. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:2–8.
72. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 273–81.
73. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R. The receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science* 1997;276: 111–3.
74. Chicheportiche Y, Bourdon P, Xu H, Hsu Y, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 1994; 272:32401–4210.
75. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004;16:550–7.
76. Jiang Z, Podack E, Levy R. Donor T cells which cannot mediate perforin-dependent and FasL-dependent cytotoxicity can effect graft vs host reactivity following allogeneic bone marrow transplantation. *Periodicum Biologorum* 1998;100:477–81.
77. Maeda Y, Levy RB, Reddy P, Liu C, Clouthier SG, Teshima T, et al. Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8₊ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:2023–7.
78. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:940–52.

79. Chinnaiyan A, O'Rourke K, Yu G, Lyons R, Garg M, Duan D, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274:990–2.
80. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789–95.
81. Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med* 1996;183:2645–56.
82. Braun YM, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1996;183:657–61.
83. Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. GVHD-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1366–71.
84. Graubert TA, Russell JH, Ley T. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996;87:1232–7.
85. Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1997;100: 904–11.
86. Ueno Y, Ishii M, Yahagi K, Mano Y, Kisara N, Nakamura N, et al. Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology* 2000;31:966–74.

87. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745–56.
88. Via C, Nguyen P, Shustov A, et al. A major role for the Fas pathway in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 1996;157:5387–93.
89. Lin T, Brunner T, Tietz B, et al. Fas ligand- mediated killing by intestinal intraepithelial lymphocytes. Participation in intestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1998;101:570 –7.
90. Liem LM, van Lopik T, van Nieuwenhuijze AEM, et al. Soluble fas levels in sera of bone marrow transplantation recipients are increased during acute graft-versus-host disease but not during infections. *Blood* 1998;91:1464–8.
91. Das H, Imoto S, Murayama T, Kajimoto K, et al. Levels of soluble FasL and FasL gene expression during the development of graft-versus-host disease in DLT treated patients. *Br J Haematol* 1999;104:795– 800.
92. Zimmerman Z, Shatry A, Deyev V, et al. Effector cells derived from host CD8 memory T cells mediate rapid resistance against minor histocompatibility antigen-mismatched allogeneic marrow grafts without participation of perforin, Fas ligand, and the simultaneous inhibition of 3 tumor necrosis factor family effector pathways. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:576–86.
93. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglan SJ, Rotolo JA, Ongchin J, et al. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 2002;8:1433–7.
94. Sato K, Nakaoka T, Yamashita N, Yagita H, Kawasaki H, Morimoto C, et al. TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *J Immunol* 2005;174:4025–33.

95. Brown GR, Lee E, Thiele DL. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J C57BL/6J x bm12)F1 mice. *J Immunol* 2002;168:3065–71.
96. Brown GR, Thiele DL. Enhancement of MHC class I-stimulated alloresponses by TNF/TNF receptor (TNFR)1 interactions and of MHC class II-stimulated alloresponses by TNF/TNFR2 interactions. *Eur J Immunol* 2000;30:2900 –7.
97. Brown GR, Lee EL, El-Hayek J, et al. IL-12- independent LIGHT signaling enhances MHC class II disparate CD4 T cell alloproliferation, IFN-gamma responses, and intestinal graft-versus-host disease. *J Immunol* 2005;174:4688–95.
98. Xu Y, Flies AS, Flies DB, et al. Selective targeting of the LIGHT-HVEM co-stimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 2007;109:4097–104.
99. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:347–56.
100. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987–95.
101. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754 –9.
102. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006;7:1250 –7.
103. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, et al. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004;127:479 –90.

104. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:384–7.
105. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, et al. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1992;175:405–13.
106. Hill GR, Teshima T, Gerbitz A, et al. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 1999;104:459–67.
107. Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, et al. Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:1113–21.
108. Piguet PF, Grau GE, Allet B, et al. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1987;166:1280–9.
109. Hill GR, Teshima T, Rebel VI, et al. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 2000;164:656–63.
110. Piguet PF. Tumor necrosis factor and graft-versus-host disease. In Burakoff SJ, Deeg HJ, Ferrara JLM, Atkinson K, eds. *Graftvs.- Host Disease*. New York: Marcel Dekker Inc., 1990:255–76.
111. Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. Rapid analysis of tumor necrosis factor-alpha mRNA expression during venoocclusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant* 1993;55: 430–2.
112. Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells during graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1993;85:558–65.

113. Holler E, Kolb HJ, Moller A, et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:1011–6.
114. Holler E, Kolb HJ, Hintermeier-Knabe R, Mittermuller J, Thierfelde S, Kaul M, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in acute graft-versus-host disease and complications following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25:1234–6.
115. Herve P, Flesch M, Tiberghien P, et al. Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;81:1993–9.
116. Uberti JP, Ayash L, Ratanatharathorn V, et al. Pilot trial on the use of etanercept and methylprednisolone as primary treatment for acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:680 –7.
117. Antin JH, Ferrara JLM. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;80:2964–80.
118. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JLM. Interleukin 1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplant*. 1993;56:1518 –23.
119. McCarthy PL, Abhyankar S, Neben S, Newman G, Sieff C, Thompson RC, et al. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. *Blood* 1991;78:1915–8.
120. Antin JH, Weisdorf D, Neuberg D, et al. Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:3479–82.

121. Falzarano G, Krenger W, Snyder KM, et al. Suppression of B cell proliferation to lipopolysaccharide is mediated through induction of the nitric oxide pathway by tumor necrosis factor- α in mice with acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996;87:2853–60.
122. Nestel FP, Greene RN, Kichian K, et al. Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis. *Blood* 2000;96:1836–43.
123. Weiss G, Schwaighofer H, Herold M. Nitric oxide formation as predictive parameter for acute graft-versus-host disease after human allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995;60:1239–44.
124. Langrehr JM, Murase N, Markus PM, Cai X, Neuhaus P, Schraut W, et al. Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J Clin Invest* 1992;90:679–83.
125. Langrehr JM, Muller AR, Bergonia HA, et al. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy during rejection and graft-versus-host disease after small-bowel transplantation in the rat. *Surgery* 1992;112:395–401.
126. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907–16.
127. Atkinson K, Incefy GS, Storb R et al. Low serum thymic hormone levels in patients with chronic graft versus host disease. *Blood* 1982; 59: 1073-7.
128. Lee SJ. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105: 4200–4206.
129. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow

transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 2002; 99: 4200–4206.

130. Spencer A, Szydlo RM, Brookes PA et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using ex vivo or in vivo T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood* 1995; 86: 3590–3597.

131. Mutis T, Gillespie G, Schrama E et al. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Natural Medicine* 1999; 5: 839–842.

132. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH et al. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004; 103: 347–352.

133. Miklos DB, Kim HT, Miller KH et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005; 105: 2973–2978.

134. Ritchie D, Seconi J, Wood C et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 706–712.

135. Dickinson AM & Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 517–525.

136. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* 2001; 19: 3685–3691.

137. Stem Cell Trialist´Colaborative group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 5074–5087.
138. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 109: 1756–1764.
139. Anderson BE, McNiff JM, Jain D et al. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105: 2227–2234.
140. Ratanatharathorn V, Ayash L, Reynolds C et al. Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2003; 9: 505–511.
141. Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2006; 108: 756–762.
142. Kotani A, Hori T, Fujita T et al. Involvement of OX40 ligand β mast cells in chronic GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2007;39: 373–375.
143. Kotani A, Ishikawa T, Matsumura Y et al. Correlation of peripheral blood OX40 β (CD134 β) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 3162–3164.
144. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A et al. Inhibition of CD4 β CD25 β regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; 108: 390–399.

145. Zhang H, Chua KS, Guimond M et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Natural Medicine* 2005; 11: 1238–1243.
146. Liston A & Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19: 176–185.
147. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007; 445: 771–775.
148. Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T et al. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2000; 164: 6067–6074.
149. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR et al. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2002; 168: 3088–3098.
150. Lin MT, Storer B, Martin PJ et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2201–2210.
151. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005; 106: 2206–2214.
152. Blazar BR & Taylor PA. Regulatory T cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 46–49.
153. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104: 2187–2193.

154. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 2903–2911.
155. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J et al. Mucosal FOXP3⁺ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107: 1717–1723.
156. Meignin V, Peffault de Latour R, Zuber J, et al. Numbers of Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2005; 33: 894–900.
157. Taylor PA, Panoskaltzis-Mortari A, Swedin JM, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4⁺ 25⁺ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004; 104:3804–3812.
158. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M et al. Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005; 105: 2220–2226.
159. Dutt S, Tseng D, Ermann J et al. Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 2007; 179: 6547–6554.
160. Zhang Y, Joe G, Hexner E et al. Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Natural Medicine* 2005; 11: 1299–1305.
161. Yamashita K, Horowitz ME, Kwatema A, et al. Unique abnormalities of CD4⁺ (b) and CD8⁺ (b) central memory cells associated with chronic graft-versus-host disease improve after extracorporeal photopheresis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006; 12: 22–30.

162. Nikolic B, Khan A & Sykes M. Induction of tolerance by mixed chimerism with nonmyeloblastic host conditioning: the importance of overcoming intrathymic alloresistance. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001; 7: 144–153.
163. Zhang Y, Hexner E, Frank D, et al. CD4⁺ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *Journal of Immunology*(Baltimore, Md.: 1950) 2007; 179: 3305–3314.
164. Cutler C & Antin JH. Chronic graft-versus-host disease. *Current Opinion in Oncology* 2006; 18: 126–131.
165. She K, Gilman AL, Aslanian S et al. Altered toll-like receptor 9 responses in circulating B cells at the onset of extensive chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007;13: 386–397.
166. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. High Levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 6107–6114.
167. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, et al. Donor CD4⁺ T and B cells in transplants induce chronic graft versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* 2006; 107: 2993–3001.
168. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-Host Disease. *Lancet* 2009 May 2;373: 1550-1561
169. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464–1472.
170. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991;28:250–259.

171. Sullivan KM, Mori M, Sanders J, et al. Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:127–134
172. Kim DH, Sohn SK, Kim JG, et al. Clinical impact of hyperacute graft-versus-host disease on results of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(10):1025-30
173. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945–956.
174. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29–52.
175. Esteban JM, Somlo G. Skin biopsy in allogeneic and autologous bone marrow transplantation patients: a histologic and immunohistochemical study and review of the literature. *Mod Pathol* 1995; 8: 59.
176. Weisdorf DJ, Snover DC, Haake R, et al. Acute upper gastrointestinal graft-vs-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy. *Blood* 1990; 76: 624-629.
177. Sale GE, Alavaikko M, Schaeffers KM, Mahan CT et al. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-vs-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp Hematol* 1992; 20:1017
178. Jabs DA, Wingard J, Green RW et al .The eye in bone marrow transplantation . *Arch Ophthalmol* 1989;107:1343-1348
179. Deeg, H.J, Antin, J.H. The clinical spectrum of acute graft versus-host disease. *Seminars in Hematology* 2006; 43: 24–31.

180. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18: 295-304.
181. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15: 825
182. Gratwohl, A., Brand, R., Apperley, J et al. Graft versus host disease and outcome in HLA-identical sibling transplant for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100: 3877–3886
183. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGMTC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005;106:1495-1500.
184. Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:755–761.
185. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic graft versus host disease syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. 1980; 69: 204-17.
186. Teshima T, Ferrara JL. Pathogenesis and prevention of acute graft-versus-host-disease. *Current opinion in organ transplantation* 2001, 6: 265-271.
187. Socié G, Schmoor C, Bethge WA, Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6375-82.
188. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic

stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6963-70.

189. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34(7):621, 2004.

190. Blanco B , Pérez-Simón J, Sánchez-Abarca LI. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 1;107(9):3575-83, 2006.

191. Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:230-6

192. Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1):117-22.

193. Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4557-63

194. Castilla C, Pérez-Simón JA, Sánchez-Guijo F, et al. Oral beclomethasone dipropionate for the treatment of gastrointestinal acute graft-versus-host disease (GVHD). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Sep;12(9):936-41

195. Villanueva FN, Pérez-Simón JA, Silva FF, et al. Oral beclomethasone dipropionate for the treatment of gastrointestinal chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Oct;15(10):1331-6.

196. Dignan F, Scarisbrick J, Cornish J, et al. Organ-specific management and supportive care in chronic graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*, 2012, 158, 62–78

197. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:1611–1628.
198. Srinivasan R, Chakravarti S, Walsh T et al. Improved survival in steroid refractory acute graft versus host disease after non-myeloablative allogeneic transplantation using a daclizumab-based strategy with comprehensive infection prophylaxis. *Br J Hematol* 124: 777, 2004
199. Couriel D, Saliba R, Hicks K et al. Tumor necrosis factor blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* 104 (3): 649, 2004.
200. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 June ; 39(2): 365–379.
201. Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, et al. 1,25-dihydroxyvitamin-D-receptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979;2:1335.
202. Makishima M, Lu TT, Xie W, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;296:1313.
203. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4990.
204. Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 1981;108:1083.
205. Abe E, Miyaura C, Tanaka H, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes fusion of mouse alveolar macrophages both by a direct mechanism and by a spleen cell-mediated indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:5583.

206. Bhalla AK, Amento EP, Serog B, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol* 1984;133:1748.
207. Adams JS, Gacad MA. Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 1985;161:755.
208. Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, et al. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest* 1983;72:1856.
209. Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, et al. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis:evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* 1981;305:440.
210. Hewison M. Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol* 1992;132:173.
211. Hewison M, Burke F, Evans KN, et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:316.
212. Koeffler HP, Amatruda T, Ikekawa N, et al. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues. *Cancer Res* 1984;44:5624.
213. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:86.
214. Koeffler HP, Reichel H, Bishop JE, et al. gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;127:596.

215. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993;82:1300.
216. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770.
217. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3.
218. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909.
219. Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* 2008;181:7115.
220. Liu N, Kaplan AT, Low J, et al. Vitamin D Induces Innate Antibacterial Responses in Human Trophoblasts via an Intracrine Pathway. *Biol Reprod* 2009;80:398.
221. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803.
222. D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve MJ, Mergely M, et al. Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology* 2009;136:1435.

223. Matsunawa M, Amano Y, Endo K, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Activator Benzo[a]pyrene Enhances Vitamin D3 Catabolism in Macrophages. *Toxicol Sci.* 2009
224. Ren S, Nguyen L, Wu S, et al. Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis. *J Biol Chem* 2005;280:20604.
225. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006;36:361.
226. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, et al. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987;61:457.
227. Dam TN, Moller B, Hindkjaer J, et al. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;1:72.
228. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164:2405.
229. Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, et al. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:701.
230. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001;167:1945.

231. O'Garra A, Barrat FJ. In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 2003;85:135.
232. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, et al. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells. *Blood* 2003;102:3314.
233. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:5382.
234. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, et al. Vitamin D and barrier function: a novel role for extrarenal 1 alpha-hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 2004;215:31.
235. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275.
236. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685.
237. Karmali R, Hewison M, Rayment N, et al. 1,25(OH)₂D₃ regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T lymphocytes. *Immunology* 1991;74:589.
238. Nunn JD, Katz DR, Barker S, et al. Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D₃. *Immunology* 1986;59:479.
239. Provvedini DM, Manolagas SC. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor distribution and effects in subpopulations of normal human T lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:774.

240. Lemire JM, Archer DC, Beck L, et al. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995;125:1704S.
241. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167:4974.
242. Overbergh L, Decallonne B, Waer M, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524–543). *Diabetes* 2000;49:1301.
243. O’Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, et al. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 2002;109:1091.
244. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, et al. A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002;51:1367.
245. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821.
246. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, et al. Immune modulatory treatment of TNBS colitis with calcitriol is associated with a change of a Th1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007
247. Liu N, Nguyen L, Chun RF, et al. Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation. *Endocrinology* 2008;149:4799.
248. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs

and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603.

249. Adorini L, Penna G, Giarratana N, et al. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89–90:437.

250. Dong X, Bachman LA, Kumar R, et al. Generation of antigen-specific, interleukin-10-producing T cells using dendritic cell stimulation and steroid hormone conditioning. *Transpl Immunol* 2003;11:323.

251. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ abrogates regulatory function. *J Clin Invest* 2009;119:387.

252. Vanham G, Ceuppens JL, Bouillon R. T lymphocytes and their CD4 subset are direct targets for the inhibitory effect of calcitriol. *Cell Immunol* 1989;124:320.

253. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:334.

254. Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, et al. Regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3739.

255. Iho S, Iwamoto K, Kura F, et al. Mechanism in 1,25(OH)₂D₃-induced suppression of helper/suppressor function of CD4/CD8 cells to immunoglobulin production in B cells. *Cell Immunol* 1990;127:12.

256. Meehan TF, DeLuca HF. CD8(+) T cells are not necessary for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5557.

257. Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, et al. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur J Immunol* 2004;34:1068.
258. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 2007;8:285.
259. Yu S, Bruce D, Froicu M, et al. Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8alpha intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20834.
260. Linda Rolf,1,2 Anne-Hilde Muris,1,2 Raymond Hupperts, et al. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014; 1317: 84–91
261. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: selfreactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev.Immunol.*2011; 11: 34–46.
262. Van Leeuwen,M. *et al.* The therapeutic potential of targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.*2009; 9: 53–57.
263. Kalampokis, I. *et al.* 2013. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15(Suppl 1): S1.
264. Mauri, C. & A. Bosma. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 221–241.
265. Fillatreau, S., Sweenie CH, McGeachy MJ, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*2002; 3: 944–950.
266. Mauri, C, Gray D, Mushtaq N, et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 2003;197: 489–501.

267. Sun, J.B. Flach CF, Czerkinsky C, et al. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J. Immunol.* 2008;181: 8278–8287.
268. Blair, P.A., Noreña LY, Flores-Borja F, et al. . CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 2010; **32**: 129–140.
269. Duddy, M., Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.*2007; 178: 6092–6099.
270. Knippenberg, S., Peelen E, Smolders J, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J. Neuroimmunol.*2011; 239: 80–86.
271. Sun, F., Ladha SS, Yang L, et al. Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2014; 49: 487–94.
272. Chen, S., Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.* 2007; 179: 1634–1647.
273. Morgan, J.W., Kouttab N, Ford D, *et al.* Vitamin D-mediated gene regulation in phenotypically defined human B cell subpopulations. *Endocrinology* 2000; 141: 3225–3234.
274. Heine, G. Niesner U, Chang HD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38: 2210–2218.

275. Lugar, P.L., Love C, Grammer AC, et al. Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2012; 7: e44362.
276. Lemire, J.M., [Adams JS](#), [Sakai R](#), et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J.Clin. Invest.* 1984; **74**: 657–661.
277. Chen,W.C., Vayuvegula B, Gupta S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of human B cell differentiation. *Clin. Exp. Immunol.* 1987; 69: 639–646.
278. Provedini, D.M., Tsoukas CD, Deftos LJ, et al. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *J. Immunol.* 1986;136:2734–2740.
279. Iho, S., Takahashi T, Kura F, et al. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro immunoglobulin production in human B cells. *J. Immunol.* 1986; 136: 4427–4431.
280. Hartmann, B., Heine G, Babina M, et al. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy* 2011; 66: 540–548.
281. Heine, G., Anton K, Henz BM, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 3395–3404.
282. Nashold, F.E., Hoag KA, Goverman J, et al. Rag-1-dependent cells are necessary for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2001; 119: 16–29.

283. Spach, K.M., Nashold FE, Dittel BN, et al. IL-10 signaling is essential for 1,25 dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2006; 177: 6030–6037.
284. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, et al. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Frontiers in Physiology* 2014; 5:1-15
285. Kreutz,M., Andreesen,R., Krause,S.W., et al. 1,25-dihydroxyvitaminD₃ production and vitaminD₃ receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993; 82, 1300–1307
286. Barbour,G.L., Coburn,J.W., Slatopolsky,E., et al. Hypercalcemia in a nephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N. Engl.J.Med* 1981; 305, 440–443.
287. Adams,J.S.,Sharma,O.P.,Gacad,M.A.,et al. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J. Clin.Invest.*1983; 72, 1856–1860.
288. Kallas,M., Green,F., Hewison,M., White,C., and Kline,G. Rare causes of calcitriol-mediated hypercalcemia: a case report and literature review. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 2010;95: 3111–3117.
289. Koeffler,H.P., Reichel,H., Bishop,J.E., et al. Gamma- Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by normal human macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1985; 127: 596–603.
290. Reichel,H., Koeffler,H.P., and Norman,A.W. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ metabolism in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60):1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of 24, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch.Biochem.Biophys* 1986; 251: 222–231.

291. Akutsu, N., Lin,R., Bastien,Y., et al. Regulation of gene expression by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analog EB1089 undergrowth-inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. *Mol.Endocrinol.*2001; 15: 1127–1139.
292. Lin, R., Nagai,Y., Sladek,R., et al. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitaminD3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol.Endocrinol.* 2002;16: 1243–1256.
293. Wang,T.T.,Tavera-Mendoza, L.E., Laperriere,D. ,et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol.Endocrinol.*2005; 19: 2685–2695.
294. Liu, P.T.,Schenk,M.,Walker,V.P., et al.Convergence of IL-1 beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoSOne* 2009; 4:e5810.
295. Wang,T.T., Dabbas,B., Laperriere,D., et al.Direct and indirect induction by 1,25- dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J. Biol.Chem.* 2010b; 285: 2227–2231.
296. Wang,T.T., Nestel,F.P., Bourdeau,V., et al. Cuttingedge:1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol* 2004. 173, 2909–2912.
297. Gombart,A.F., Borregaard,N., and Koeffler,H.P. (2005). Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEBJ.* 2005; 19: 1067–1077.
298. Moresco,E.M., LaVine,D., and Beutler,B. Toll-like receptors. *Curr.Biol.* 2011; 21: R488–R493.
299. Liu, P.T., Stenger,S. ,Li,H., et al. Toll- like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311: 1770–1773.

300. Vergne,I., Chua,J., Singh,S.B., et al. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*2004; 20: 367–394.
301. Bacchetta,J.Z.J., Sea,J.L., Chun,R.F., et al. Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitaminD. *J. Am.Soc. Nephrol.*2013b; 25: 564–572.
302. Ganz, T. Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr.Opin.Immunol.* 2009; 21: 63–67.
303. Drakesmith,H.and Prentice,A.M . Hepcidin and the iron-infection axis. *Science* 2012; 338: 768–772.
304. Sadeghi,K., Wessner,B., Laggner,U., et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur.J. Immunol.*2006; 36: 361–370.
305. Kim,T.H., Lee,B., Kwon,E., et al. Regulation of TREM-1 expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human monocytes/macrophages. *Immunol.Lett.*2013; 154: 80–85.
306. Brennan,A.,Katz,D.R.,Nunn,J.D.,et al .Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitaminD3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987; 61: 457–461.
307. Fritsche,J., Mondal,K, Ehrnsperger,A., et al. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood* 2003;102: 3314–3316.
308. Hewison,M., Freeman,L., Hughes,S.V., et al. (2003). Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2003;170: 5382–5390.
309. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu.Rev.Immunol.*2005; 23: 275–306.

310. Steinman,R.M., Hawiger,D., and Nussenzweig,M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2003; 21: 685–711.
311. Penna,G.,Amuchastegui,S.,Giarratana,N., et al.1,25-dihydroxyvitamin d3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendriticcells. *J. Immunol.* 2007; 178: 145–153.
312. Ferreira,G.B.,Kleijwegt,F.S.,Waelkens,E.,Lage,K.,Nikolic,T.,Hansen,D.A., et al.Differential protein pathways in1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells. *J. Proteome Res.*2012; 11. 941–971.
313. Ravid,A., Koren,R., Novogrodsky,A., et al.1,25- DihydroxyvitaminD3 inhibits selectively the mitogenic stimulation of mouse medullary thymocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*1984; 123: 163–169.
314. Provvedini,D.M., Tsoukas,C.D., Deftos,L.J., et al. 1,25- dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 1983;221: 1181–1183.
315. Bhalla,A.K. ,Amento,E.P., Clemens,T.L., et al. Specific high affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin.Endocrinol.Metab.*1983; 57: 1308–1310.
316. Karmali,R., Hewison,M., Rayment,N., et al. (1991). 1,25(OH)₂D₃ regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T lymphocytes. *Immunology* 1991;74: 589–593.
317. Lemire,J.M., Archer,D.C., Beck,L., et al. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J. Nutr.* 1995;125: 1704S–1708S.
318. Boonstra,A., Barrat,F.J., Crain,C., et al. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.* 2001;167: 4974–4980.

319. Mahon,B.D., Wittke,A., Weaver,V., et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J. Cell.Biochem.* 2003;89: 922–932.
320. Penna,G., Amuchastegui,S., Cossetti,C., et al. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in non obese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J. Immunol.* 2006;177: 8504–8511.
321. Tang,J., Zhou,R., Luger,D., et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J. Immunol.* 2009; 182: 4624–4632.
322. Rigby,W.F., Yirinec,B., Oldershaw,R.L., et al. Comparison of the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on T lymphocyte subpopulations. *Eur.J.Immunol.* 1987; 17: 563–566.
323. Provvedini,D.M., and Manolagas,S.C. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor distribution and effects in subpopulations of normal human T lymphocytes. *J. Clin.Endocrinol.Metab.* 1989;68: 774–779.
324. Veldman,C.M., Cantorna,M.T. ,and DeLuca,H.F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch.Biochem.Biophys.* 2000; 374: 334–338.
325. Ooi, J.H., McDaniel,K.L., Weaver,V.,and Cantorna,M.T. Murine CD8+T cells but not macrophages express the vitamin D1 alpha-hydroxylase. *J. Nutr. Biochem.* 2014;25: 58–65.
326. Cheroutre,H., and Lambolez,F. Doubting theTCR coreceptor function of CD8 alpha alpha. *Immunity* 2008; 28: 149–159.
327. Yu,S., Bruce,D., Froicu,M., et al. Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8 alpha alpha intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut

of vitamin D receptor KO mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 2008;105: 20834–20839.

328. Sigmundsdottir,H., Pan,J., Debes, G.F., et al. DCs metabolize sun light-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat.Immunol.*2007; 8. 285–293.

329. Barrat,F.J., Cua,D.J., Boonstra,A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1(Th1) and Th2-inducing cytokines. *J. Exp.Med.* 2002;195: 603–616.

330. Jeffery,L.E., Burke,F., Mura,M., et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J. Immunol.*2009; 183: 5458–5467.

331. Jeffery,L.E., Wood,A.M., Qureshi,O.S, et al. Availability of 25-Hydroxyvitamin D3 to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J. Immunol.* 2012;189: 5155–5164.

332. Shiozawa,K., Shiozawa,S., Shimizu,S., et al. 1 alpha,25- dihydroxyvitamin D3 inhibits pokeweed mitogen-stimulated human B-cell activation: an analysis using serum-free culture conditions. *Immunology* 1985;56: 161–167.

333. Iho,S., Takahashi, T.,Kura,F., et al. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro immunoglobulin production in human B cells. *J. Immunol.* 1986; 136: 4427–4431.

334. Chen, S., Sims,G.P., Chen,X.X., et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.*2007; 179: 1634–1647.

335. Heine,G., Niesner,U., Chang,H.D., et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur.J.Immunol.* 2008;38: 2210–2218.
336. Shirakawa,A.K., Nagakubo,D., Hieshima,K., et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces CCR10 expression in terminally differentiating human B cells. *J. Immunol.* 2008;180: 2786–2795.
337. Nakayama,Y., Stabach,P., Maher,S.E., et al. A limited number of genes are involved in the differentiation of germinal center B cells. *J. Cell.Biochem.*2006; 99: 1308–1325.
338. Chen, L., Cencioni, M.T., Angelini, D.F., et al. Transcriptional profiling of gamma delta T cells identifies a role for vitaminD in the immunoregulation of the V gamma 9 V delta 2 response to phosphate-containing ligands. *J. Immunol.* 2005; 174: 6144–6152.
339. Wilkinson, R.J., Llewelyn,M., Toossi, Z., et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London:a case-control study. *Lancet* 2000; 355: 618–621.
- 340.Ustianowski, A., Shaffer, R., Collin, S., et al. Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign- born persons with tuberculosis in London. *J. Infect.* 2005; 50: 432–437.
- 341.Williams, B., Williams, A.J., and Anderson, S.T.Vitamin D deficiency and insufficiency in children with tuberculosis. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2008; 27: 941–942.
342. Wejse, C., Gomes, V.F., Rabna, P,et al. Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis:a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am.J.Respir.Crit.CareMed.* 2009;179: 843–850.

343. Martineau, A.R., Timms, P.M., Bothamley, G.H., et al. High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 242–250.
344. Coussens, A.K., Wilkinson, R.J., Hanifa, Y., et al. Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2012; 109: 15449–15454.
345. Jeng, L., Yamshchikov, A.V., Judd, S.E., Blumberg, H.M., Martin, G.S., Ziegler, T.R., et al. Alterations in vitamin D status and antimicrobial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J. Transl.Med.* 2009; 7: 28.
346. Cannell, J.J., Vieth, R., Umhau, J.C., et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol.Infect.* 2006; 134: 1129–1140.
347. Hossein-nezhad, A., Spira, A., and Holick, M.F. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. *PLoSOne* 2013;8:e5 8725.
348. Lagishetty, V., Misharin, A.V., Liu, N. Q., et al. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology* 2010; 151: 2423–2432.
349. Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat.Immunol.* 2003;4: 269–273.
350. Packey, C.D., and Sartor, R.B. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 2009; 22: 292–301.
351. Lauridsen, A.L., Vestergaard, P., Hermann, A.P., et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are

related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 2005; 77: 15–22.

352. Lauridsen, A.L., Vestergaard, P., and Nexø, E. Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women. *Clin. Chem.* 2001; 47: 753–756.

353. Wang, T.J., Zhang, F., Richards, J.B., et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010a; 376: 180–188.

354. Chun, R.F., Lauridsen, A.L., Suon, L., et al. Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 3368–3376.

355. Chun, R.F., Peercy, B.E., Adams, J.S., et al. Vitamin D binding protein and monocyte response to 25-hydroxy vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D: analysis by mathematical modeling. *PLoS One* 2012; 7:e30773.

356. Hewison, M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010; 39(2): 365–379.

357. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7:439.

358. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266.

359. Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:208.

360. Nursyam EW, Amin Z, Rumende CM. The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesion. *Acta Med Indones* 2006; 38:3.

361. Montoya,D., Cruz,D., Teles,R.M., et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial program sin leprosy. *CellHostMicrobe* 2009; 6: 343–353.
362. Edfeldt, K., Liu,P.T., Chun,R., et al. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*2010; 107: 22593–22598.
- 363.Liu, P.T., Wheelwright,M., Teles,R., et al. Micro RNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat.Med.* 2012; 18: 267–273.
- 364.Ketting,R.F. Micro RNA biogenesis and function: an overview. *Adv.Exp. Med.Biol.* 2011; 700: 1–14.
- 365.Kallas,M., Green,F., Hewison,M., et al. Rare causes of calcitriol-mediated hypercalcemia: a case report and literature review. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 2010; 95: 3111–3117.
- 366.Chandel, N., Sharma,B., Husain,M., Salhan,D., Singh,T., Rai,P., et al. HIV compromises integrity of the podocyte actin cytoskeleton through down regulation of the vitamin D receptor. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* 2013; 304: F1347–F1357.
- 367.Danziger,J. The bone-renal axis in early chronic kidney disease: an emerging paradigm.*Nephrol.Dial.Transplant* 2008; 23: 2733–2737.
- 368.Isakova,T., Wahl,P., Vargas,G.S., et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *KidneyInt.* 2011; 79: 1370–1378.
- 369.Shimada, T., Hasegawa,H., Yamazaki,Y., et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. BoneMiner.Res.* 2004; 19: 429–435.

370. Bacchetta,J., Sea,J.L., Chun,R.F., et al. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25- dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J. BoneMiner.Res.* 2013a; 28: 46–55.
371. Raghuwanshi A, Joshi SS, Christakos S. Vitamin D and multiple sclerosis. *J Cell Biochem* 2008;105:338.
372. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res* 2007;85:2480.
- 373.Spach KM, Hayes CE. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol* 2005;175:4119.
- 374.Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, et al. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:6030.
375. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, et al. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics* 2004;18:141.
- 376.Littorin B, Blom P, Scholin A, et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nation wide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006;49:2847.
- 377.Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, et al. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1247.
378. Harris SS. Vitamin D in type 1 diabetes prevention. *J Nutr* 2005;135:323.

379. Ramos-Lopez E, Jansen T, Ivaskevicius V, et al. Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079:327.
380. Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56(10): 2016-21
381. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004;47:451.
382. Pappa HM, Gordon CM, Saslowsky TM, et al. Vitamin D status in children and young adults with inflammatory bowel disease. *Pediatrics* 2006;118:1950.
383. Pappa HM, Grand RJ, Gordon CM. Report on the vitamin D status of adult and pediatric patients with inflammatory bowel disease and its significance for bone health and disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1162.
384. Vagianos K, Bector S, McConnell J, et al. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007;31:311.
385. Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* 2007;8:5.
386. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, et al. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003;17:2386.
387. Liu N, Nguyen L, Chun RF, et al. Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation. *Endocrinology* 2008;149:4799.
388. Abreu MT, Kantorovich V, Vasiliauskas EA, et al. Measurement of vitamin D levels in inflammatory bowel disease patients reveals a subset of Crohn's

disease patients with elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and low bone mineral density. *Gut* 2004;53:1129-36.

389.Packey CD, Sartor RB. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22:292-301.

390.Aric C. Hall,Mark B. Juckett. The Role of Vitamin D in Hematologic Disease and Stem Cell Transplantation. *Nutrients* 2013, 5, 2206-2221

391.Bunce, C.M.; Brown, G.; Hewison, M. Vitamin D and hematopoiesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 1997, 8, 245–251.

392.Grande, A.; Montanari, M.; Tagliafico, E., et al. Physiological levels of 1alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71, 641–651.

393.O'Kelly, J.; Hisatake, J.; Hisatake, Y, et al. Normal myelopoiesis but abnormal t lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J. Clin. Investig.* 2002, 109, 1091–1099.

394.Friedman, A.D. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007, 26, 6816–6828.

395.Labrecque, J.; Allan, D.; Chambon, P., et al. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood* 1998, 92, 607–615.

396.Kim, M.; Mirandola, L.; Pandey, A., et al. Application of vitamin D and derivatives in hematological malignancies. *Cancer Lett.* 2012, 319, 8–22.

397.Hughes, P.J.; Marcinkowska, E.; Gocek, E., et al. Vitamin D3-driven signals for myeloid cell differentiation—Implications for differentiation therapy. *Leuk. Res.* 2010, 34, 553–565.

398. Koeffler, H.P.; Hirji, K.; Itri, L. 1,25-dihydroxyvitamin D₃: In vivo and in vitro effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treat. Rep.* 1985, 69, 1399–1407.

399. Grande, A.; Montanari, M.; Tagliafico, E., et al. Physiological levels of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71: 641–651.

400. Harrison, J.S.; Bershadskiy, A. Clinical experience using vitamin D and analogs in the treatment of myelodysplasia and acute myeloid leukemia: A review of the literature. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 2012, 125814.

401. Molnar, I.; Stark, N.; Lovato, J., et al. Treatment of low-risk myelodysplastic syndromes with high-dose daily oral cholecalciferol (2000–4000 IU vitamin D₃). *Leukemia* 2007, 21, 1089–1092.

402. Motomura, S.; Kanamori, H.; Maruta, A., et al. The effect of 1-hydroxyvitamin D₃ for prolongation of leukemic transformation-free survival in myelodysplastic syndromes. *Am. J. Hematol.* 1991, 38, 67–68.

403. Siitonen, T.; Timonen, T.; Juvonen, E., et al. Valproic acid combined with 13-cis retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2007, 92, 1119–1122.

404. Ferrero, D.; Darbesio, A.; Giai, V.; et al. Efficacy of a combination of human recombinant erythropoietin + 13-cis-retinoic acid and dihydroxylated vitamin D₃ to improve moderate to severe anaemia in low/intermediate risk myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 2009, 144, 342–349.

405. Ferrero, D.; Bruno, B.; Pregno, P.; et al. Combined differentiating therapy for myelodysplastic syndromes: A phase II study. *Leuk. Res.* 1996, 20, 867–876.

406.Slapak, C.A.; Desforges, J.F.; Fogaren, T.; et al. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 1992, 41, 178–183.

407.Ferrero, D.; Campa, E.; Dellacasa, C.; et al. Differentiating agents + low-dose chemotherapy in the management of old/poor prognosis patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2004, 89, 619–620.

408. Hellstrom, E.; Robert, K.H.; Samuelsson, J.; et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with retinoic acid and 1 alpha-hydroxy-vitamin D3 in combination with low-dose ara-c is not superior to ara-c alone. Results from a randomized study. The scandinavian myelodysplasia group (smg). *Eur. J. Haematol.* 1990, 45, 255–261.

409. Park, W.H.; Seol, J.G.; Kim, E.S.; et al. The induction of apoptosis by a combined 1,25(OH)2D3 analog, EB1089 and TGF-beta1 in NCI-H929 multiple myeloma cells. *Int. J. Oncol.* 2002, 20, 533–542.

410.Park, W.H.; Seol, J.G.; Kim, E.S.et al. Cell cycle arrest induced by the vitamin D(3) analog EB1089 in NCI-H929 myeloma cells is associated with induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Exp. Cell Res.* 2000, 254, 279–286.

411. Puthier, D.; Bataille, R.; Barille, S.; et al. Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D3 derivative, alone or in association with dexamethasone. *Blood* 1996, 88, 4659–4666.

412. Luong, Q.T.; Koeffler, H.P. Vitamin D compounds in leukemia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005, 97, 195–202.

413. Middleton, P.G.; Cullup, H.; Dickinson, A.M.; et al. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002, 30, 223–228.

414. Cho, H.J.; Shin, D.Y.; Kim, J.H.; et al. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms on clinical outcomes of HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Transplant.* 2012, 26, 476–483.

415. Bogunia-Kubik, K.; Middleton, P.; Norden, J.; et al. Association of vitamin D receptor polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Immunogenet.* 2008, 35, 207–213.

416. Pakkala, I.; Taskinen, E.; Pakkala, S.; et al. Mc1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001, 27, 863–867.

2. Discusión

1. Glotzbecker B, Ho VT, Aldridge J, Kim HT, Horowitz G, Ritz J, Soiffer R, Avigan D, Rosenblatt J. Low levels of 25-hydroxyvitamin D before allogeneic hematopoietic SCT correlate with the development of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Apr;48(4):593-7

2. Marazuela, M. Déficit de vitamina D en el adulto: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Endocrinol Nutr.* 2005;52(5):215-23.

3. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001;22:477-501.

4. Gordon CM, DePeter K, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158:531-7.
5. Lee, P, Eisman, JA, Center, JR, et al. Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009; 360;18: 1912-1914.
6. Thomas MK, Donald M, Lloyd-Jones, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338;12: 777-783.
7. Pakkala I, Taskinen E, Pakkala S, et al. MC1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27, 863–867.
8. Ganetsky A , Richman LP , Frey NV , et al. Vitamin D deficiency predicts acute cutaneous graft-versus-host disease in reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (2014) S257eS285.
9. Magnus E.A. Hansson M. E. A. , Norlin A.C., Omazic B, et al. Vitamin D Levels Affect Outcome in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(10):1537-1543.
10. Brum DG, Comini-Frota ER, Vasconcelos CCF, et al. Supplementation and therapeutic use of vitamin D in patients with multiple sclerosis: Consensus of the Scientific Department of Neuroimmunology of the Brazilian Academy of Neurology. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(2):152-156.
11. Soilu-Hänninen M, Aivo J, Lindström BM, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon β -1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:565-571.
12. Kampman MT, Steffensen LH, Mellgren SI, et al. Effect of vitamin D3 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.

13. Sümbül AT, Sezer A, Kavvasoglu G, et al. Low serum levels of vitamin D in metastatic cancer patients: a case-control study. *Med Oncol* 2014; 31; 861.

14. Ma Y, Zhang P, Wang F, et al. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(28):3775-3782.

15. Gandini S, Boniol M, Haukka J, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *International Journal of Cancer*. 2011;128(6):1414-1424.

16. Woolcott CG, Wilkens LR, Nomura AM, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010;19(1):130-134.

17. Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, et al. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ*. 2010;340:b5500.

18. Manson JE, Bassuk SS, Lee IM, et al- The VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemp Clin Trials* 2012 January ; 33(1): 159–171.

19. Chung M, Lee J, Terasawa T, et al. Vitamin D With or Without Calcium Supplementation for Prevention of Cancer and Fractures: An Updated Meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2011;155(12):827-838.

20. Bell DA, Crooke MJ, Hay N, Glendenning P. Prolonged vitamin D intoxication: presentation, pathogenesis and progress. *Intern Med J* 2013; 43:1148-1150.

21. Gallo S, Comeau K, Vanstone C, et al. Effect of different dosages of oral vitamin D supplementation on vitamin D status in healthy, breastfed infants: a randomized trial. *JAMA* 2013;309:1785-1792.
22. Burton JM, Kimball S, Vieth R, et al. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:1852-1859.
23. Allen AC, Kelly S, Basdeo SA, et al. A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers. *Mult Scler* 2012;18:1797-1800.
24. von Bahr L, Blennow O, Alm J, et al. Increased incidence of chronic GvHD and CMV disease in patients with vitamin D deficiency before allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* , (1 June 2015).
25. Wallace G, Jodele S, Howell J, et al. Vitamin D Deficiency and Survival in Children after Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun 18. pii: S1083-8791(15)00411-5.
26. Yamshchikov AV, Desai NS, Blumberg HM, et al. Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocr Pract*. 2009 ; 15(5): 438–449.
27. Connor RI, Rigby WF. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits productive infection of human monocytes by HIV-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:852–859
28. Hanson LK, Slater JS, Karabekian, et al. Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *Journal of Virology* July 1999, p. 5970–5980
29. Cobo ER and Chadee K. Antimicrobial human β -defensins in the colon and their role in infectious and non-infectious diseases *Pathogens* 2013, 2, 177-192.

30. Gaudreault, E.; Gosselin, J. Leukotriene b4-mediated release of antimicrobial peptides against cytomegalovirus is blt1 dependent. *Viral Immunol.* 2007, 20, 407–420.
31. Vitamin D and the human antimicrobial peptide LL-37 enhance group A Streptococcus resistance to killing by human cells
32. Rosenblatt J, Bissonnette A, Ahmad R, et al. Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplantation* (2010) 45, 1463–1468.
33. Zhang Y, Zhu JJ, Carroll R, Levine B, et al . Dendritic cell-activated CD44 high CD8 T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity. *Blood* 2004 ;103: 3970–3978.
34. Zheng, H., Matte-MartoneC, Li H, et al. Effector memory CD4 T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-hostdisease. *Blood* 2008 111: 2476–2484.
35. Zheng H, Matte-Martone C, Jain D. Central Memory CD8 T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. *J Immunol* 2009 182: 5938 –5948.
36. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nature Immunology* 8, 285 - 293 (2007).
37. Dong S, Maiella S, Xhaard A, et al. Multiparameter single-cell profiling of human CD4+FOXP3+ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease.*Blood.* 2013 Sep 5;122(10):1802-12.
38. Murase K, Kim HT, Bascug ORG, et al. Increased mitochondrial apoptotic priming of human regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2014;99: 1499-1508.

39. Tang Q, Bluestone J. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology* 2008; 9: 239 - 244.
40. Goff J.P, Reinhardt T.A, Beckman M.J., et al. Contrasting effects of exogenous 1,25-Dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] versus endogenous 1,25-(OH)₂D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* 1990; 126: 1031–1035.
41. Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, et al. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. *Hum Immunol.* 2012 Jul;73(7):693-8.
42. Jirapongsananuruk O¹, Melamed I, Leung DY, et al. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Nov;106(5):981-5.
43. Cutolo M, Paolino S, Sulli A, et al. Vitamin D, steroid hormones and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2014; 1317: 39-46.
44. F Silva, JA Perez-Simon, T Caballero-Velazquez, et al. Effect of vitamin D treatment in chronic GVHD. *Bone Marrow Transplantation* 2011 46,1395–1397.
45. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic?. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2008 Vol. 21, No. 2, pp. 101–117.
46. Hayashida J-N, Nakamura S, Toyoshima T, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplantation* (2013) 48, 115–123.
47. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 2012 119 (1): 285-295.

48. Brügger M-Ch, Klein I, Greinix H, et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood* 2014 123 (2): 290-299.
49. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007 109: 1756-1764.
50. Peric Z, Cahu X, Malard F, et al. Peripheral blood plasmacytoid dendritic cells at day 100 can predict outcome after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1431-6.
51. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P, et al. Immune cell subset counts associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20 : 450e462
52. Xystrakis E, Bernard I, Dejean AS, et al. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RC high but not the CD45RC low subset. *Immunol*. 2004;34:408-417
53. Bunce, C. and Bell, E. B. CD45 RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J. Exp. Med*. 1997.185:767–776
54. Sanchez-Garcia J, Serrano J, Gómez P, et al. The impact of acute and chronic graft-versus-host disease on normal and malignant B-lymphoid precursors after allogeneic stem cell transplantation for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* January 2006 91: 340-347.
55. Bennett SR, Carbone FR, Toy T, et al. B cells directly tolerize CD8 T cells. *J Exp Med*. 1998;188(11):1977-1983.
56. Ho IIsberg P, Batra V, Dressel A, et al. Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol*. 1996;157(12):5269-5276.

57. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, et al. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8 T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol.* 2003;170(12):5897-5911
58. Kim HO, Oh HJ, MD, Lee JW, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. *Korean J Pediatr* 2013;56(1):26-31
59. Kheav VD, Busson M, Scieux C, et al. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2014 Dec; 99(12): 1860–1867.
60. Muntasell A, Magri G, Pende D, et al. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood.* 2010 Jun 24;115(25):5170-9.
61. Diermayr S, Himmelreich H, Durovic B, et al. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. February 1, 2008; *Blood:* 111 (3): 1428-36
62. Johnson-Leger S, Christensen J and Klaus GGB. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *International Immunology*, Vol. 10, No. 8, pp. 1083–1091

