

HISTORIA - SEGUNDA PARTE*

Historia de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la vitamina D

Antonio Iglesias Gamarra¹, José Félix Restrepo Suárez²

Resumen

La historia moderna en relación con los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la hormona D se inicia con los trabajos del bioquímico de origen noruego, R. Nicolaysen, quien, influido por los trabajos de las dietas en los diferentes animales, concluye que la captación del calcio es guiada por un factor desconocido que “alerta” al intestino a las necesidades del calcio y termina con los estudios del investigador sueco Arvid Carlsson, premio nobel de medicina por sus hallazgos en las señales de transducción a nivel del sistema nervioso central; además realiza varios trabajos con la Vitamina D que demuestran las mismas ideas de Nicolaysen. En estos 60 años se narra la historia de la hormona D, se describen los estudios de Wasserman y los grandes trabajos de Héctor De Luca, descubridor de la 25 hidroxivitamina D, y Fraser y Kodicek, el calcitriol. Se describe a la vez el conocimiento de la adaptación intestinal, la fotobiología de la vitamina D, los otros metabolitos de la vitamina D, los análogos de los hormona D, el sistema enzimático CYP, el receptor de la vitamina D, la transcaltaquia y los nuevos mecanismos de la hormona D. Faltando por descubrir muchos efectos de esta hormona y que le brindaron un futuro más halagüeño.

Palabras clave: vitamina D, hormona D, metabolitos de la vitamina D, análogos de la vitamina D, raquitismo y osteomalacia.

Summary

Modern history about hormone D physiologic and biochemical mechanisms began with the works by Norwegian biochemist R. Nicolaysen, who, influenced by the work of diets in the several different animals, drew the conclusion that calcium uptake is guided by an unknown factor “warning” the bowl about calcium needs, and finished with the works of Sweden researcher Arvid Carlson, Nobel Prize of medicine awarded by his studies about transduction signals at central nervous system; he carried out too several works related to Vitamin D and documented the same ideas proposed by Nicolaysen. Throughout these sixty years, hormone D history has been counted, Wasserman’s studies described, and Hector De Luca remarkable works who discovered the 25 hydroxyvitamin D and Fraser and Kodiercek calcitriol. The knowledge of intestinal adaptation, vitamin D photobiology, the other vitamin D metabolites, hormone D analogues, CYP enzyme system, vitamin D receptor, transcaltachia and the new hormone D mechanisms are described. It remains to discover many effects of this hormone and that future may be even more promising.

* Ver Primera Parte en: Revista Colombiana de Reumatología. Vol. 12 No. 1, marzo 2005, pp. 11-32.

1 Profesor Titular de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

2 Profesor Asociado de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Recibido para publicación: diciembre 17/2004

Aceptado en forma revisada: febrero 18/2005

Key words: vitamin D, hormone D, vitamin D metabolites, vitamin D analogues, rickets and osteomalacia.

Nicolaysen¹³⁰⁻¹³⁷ entre 1937 y 1967, con pocas herramientas de investigación, se dedica a descifrar los mecanismos de absorción de calcio y analiza por primera vez un concepto que se convierte en uno de los paradigmas importantes de la vitamina D: a través de una serie de métodos fisiológicos demuestra que la vitamina D incrementa la absorción intestinal de calcio en las ratas raquílicas, confirmando la hipótesis de Orr y cols.¹²⁸ de 1923. Nicolaysen¹³² utilizó una asa intestinal aislada, demostrando en las ratas deficientes de vitamina D una alteración en la absorción intestinal de calcio y un trastorno en el balance del mismo. Aun cuando este método tenía una desventaja al mantener un estado fisiológico *ex vivo*, no era adecuado para el análisis del transporte activo.

Nicolaysen y cols.¹³⁴⁻¹³⁷ proponen en 1953 la presencia de un factor endógeno humoral del hueso que, en conjunción con la vitamina D, controla la absorción del calcio del intestino. La técnica se utilizó durante casi dos décadas hasta que Wilson y Wiseman¹³⁸, en 1954, y Schachter y Rosen¹³⁹ aplican la técnica del saco intestinal evertido y logran demostrar algunas de las observaciones de Nicolaysen¹³²⁻¹³⁷: que el sistema de transporte intestinal de calcio tiene una capacidad finita, requiere energía metabólica, y que el calcio se moviliza de la mucosa a la superficie serosa contra un gradiente de concentración. Con estos dos conceptos relacionados con la absorción intestinal de calcio a través de la vitamina D y la teoría del transporte activo del calcio en la luz intestinal se llega a la década de 1960, en la cual se realizan una serie de descubrimientos determinantes para la vitamina D^{139,140}.

Década de 1960

Wasserman y cols.^{141,142}, en 1961 en ratones, y Schachter¹⁴³, en 1963, demuestran a través de una serie de evidencias que el calcio es transportado en contra de un gradiente electroquímico y documentan que el calcio se moviliza a través de un proceso de transporte activo. Estos resultados, especialmente relacionados con el transporte de calcio, fueron confirmados por técnicas *in vitro* y *ex vivo* por

Harrison y Harrison^{144,145} desde 1960; por Krawitt y Schedl¹⁴⁶ en 1968; por Rasmussen¹⁴⁷, quien analiza la influencia de la paratormona en este transporte, en 1959; y por Wasserman y Kallfelz¹⁴⁸ en 1962. En esta década se logró introducir una tecnología más avanzada (modificando el asa aislada y el saco intestinal evertido, e implementando el aparato de Ussing¹⁴⁹), se logró desarrollar equipos más sofisticados y se analizan otras técnicas que denominaron de cortocircuito.

Walling y Rothman^{150,151}, en 1969 y 1970, y el grupo conformado por Martín y DeLuca^{152,153} publicaron varios artículos demostrando la saturación quinética de la captación de calcio a nivel del borde mucoso de las células epiteliales intestinales; y para ello calcularon la constante de saturación (Km) entre 1,25 y 2 mM. Demuestran objetivamente que el transporte de calcio requiere energía celular, necesita un transportador y posteriormente se produce la translocación, proceso que es independiente del fósforo¹³⁹. Adams y Norman¹⁵⁴ en 1970, utilizando el método de cortocircuito, proveen nuevas evidencias de que el calcio es translocado de acuerdo con lo que planteaba Ussing¹⁴⁹. Esta década de 1960 debe recordarse como la de la vitamina D, ya que se realizaron extraordinarios descubrimientos sobre la fisiología y la bioquímica de esta vitamina.

Transporte de calcio y translocación

Uno de los problemas que tenían los investigadores era determinar la forma en que el calcio penetra las microvellosidades, se mueve a través de las células epiteliales y entra a la circulación, todas estas observaciones se consideraban un rompecabezas. El optimismo surge cuando Wasserman y cols.¹⁴¹ en 1961, en la revista *Science*, demuestran la existencia de una proteína transportadora de calcio intestinal; posteriormente este grupo confirmó la existencia de esta proteína transportadora de calcio en varias especies, en 1966, 1967, 1968, 1970 y 1971¹⁵⁵⁻¹⁶¹. MacGregor y cols.¹⁶² en 1970 introducen al estudio la leucina marcada con tritio [³H] y demuestran la síntesis de novo de la proteína transportadora de calcio. Posterior a este hallazgo, la investigación se centra en el estudio de la translocación

de calcio; este extraordinario grupo de Wasserman y Taylor^{141, 142, 155-161}, a través de la inmunofluorescencia y con [³²P], plantea que la proteína transportadora de calcio también participa en la translocación del calcio y que ésta se encuentra en la cubierta de la región de las microvellosidades.

Martin, Melancon y DeLuca¹⁶³ demuestran en 1969 que el calcio inicialmente es captado a nivel de la mucosa de la luz intestinal, especialmente a nivel del borde en cepillo, que las preparaciones del borde en cepillo poseen actividad de ATPasa y que ésta se incrementa por acción de la vitamina D, lo que induce un aumento de la absorción del calcio dependiente de ATPasa. Un año después Haussler, Nagode y Rasmussen¹⁶⁴ demuestran, en el pollo, que la vitamina D puede activar la fosfatasa alcalina y la ATPasa, y que el incremento de estas enzimas induce una mayor absorción del calcio intestinal. Posteriormente se descubre que al aplicar L-fenilalanina, berilio y zinc, sustancias todas conocidas como inhibidoras de la fosfatasa alcalina, también se inhibe la ATPasa, lo que sugiere la presencia de un complejo enzimático, localizado en el borde en cepillo, que posee ambas actividades enzimáticas, y que este complejo bienzimático participa en la movilización del calcio en las células de la mucosa. Una vez que el calcio atraviesa el borde luminal de las células epiteliales avanza hacia el borde seroso. Al pasar el calcio a nivel intracelular su concentración se eleva hasta 5mM durante el proceso de la absorción, de acuerdo al estudio de Wasserman y cols.^{141, 142, 155-161}.

En otro trabajo interesante, Martin y DeLuca¹⁵² demuestran el efecto estimulador del sodio sobre el transporte *in vitro* del calcio y sugieren que el sodio actúa sobre la membrana basal-lateral de las células epiteliales. Después de múltiples experimentos de Martin y DeLuca^{152, 153} y, especialmente, de Wasserman y sus cols.^{155-161, 165, 166} este último concluye en forma brillante en 1970¹⁶⁶ que los dos componentes del borde en cepillo en la luz intestinal (la proteína transportadora de calcio y la ATPasa y la fosfatasa alcalina dependiente de calcio) actúan juntas en la movilización del calcio dentro de la célula. La proteína transportadora de calcio actúa como un concentrador en las microvellosidades, mientras que la ATPasa y la fosfatasa alcalina tienen la función de actuar como una bomba para

mover el calcio en el citosol y a través de las mitocondrias¹³⁹.

Vitamina D y absorción de fosfatos

Los estudios de Nicolaysen^{130, 131, 133} en la década de 1930 demostraban que la absorción de fosfato era independiente de la vitamina D y que la absorción de fosfato lo era a su vez de la absorción del calcio. Estos conceptos empiezan a cambiar sólo hasta finales de la década de 1960 gracias a Taylor y Wasserman^{165, 166}, quienes demuestran que la absorción de fosfato es sensible a los cambios en la dieta del calcio, al observar que los pollos alimentados con una dieta baja en calcio muestran un incremento en la absorción del fosfato, y concluyen que este proceso de absorción es independiente del contenido del calcio en la luz intestinal y que la vitamina D podía actuar en el proceso de la absorción del fosfato.

Absorción, dieta, vitamina D y adaptación intestinal

Fairbanks y Mitchell¹⁶⁷ en 1936, Rottensten¹⁶⁸ en 1938 y Nicolaysen¹³³ en 1943 observaron durante varios años que los animales alimentados con una dieta baja en calcio generaban una adaptación del intestino al incrementar eficientemente la absorción del calcio intestinal, pero que esta adaptación del intestino dependía especialmente de la vitamina D; como lo demostró Nicolaysen^{133, 134}, en 1943, esta adaptación no depende de las glándulas.

Nicolaysen¹³⁶, para explicar el incremento de la absorción del calcio a nivel intestinal, planteó la presencia de un "factor endógeno humoral" del hueso que actuaba en conjunción con la vitamina D. Posteriormente el grupo de DeLuca, de acuerdo con esa observación de Nicolaysen¹³⁶, pudo demostrar que la adaptación intestinal dependía del metabolismo de la 25-hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D₃)¹³⁹.

Posteriormente se demostró que la paratormona (PTH) induce la síntesis de la 1,25(OH)₂D₃, que es la responsable del incremento de la absorción del calcio intestinal y de la adaptación intestinal al calcio y al fósforo de la dieta. Durante una ingesta

baja de calcio se incrementa la síntesis de PTH y ésta a la vez incrementa la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; en contraposición, cuando existe una alta ingesta de calcio se reduce la producción de PTH y por ende la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ¹⁶⁹. De esta manera, el intestino a través de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se adapta a los extremos de una dieta baja o alta en calcio y con ello se evita la formación de cálculos renales en aquellas personas que reciben suplementos de calcio para el tratamiento o profilaxis de la osteoporosis¹⁷⁰.

La escuela de Wisconsin

El profesor Hector F. DeLuca es uno de los más grandes, si no el más grande, investigador de la vitamina D: "Harry Steenbock professor of Biochemistry" de la Universidad de Wisconsin.

La década de 1960 fue prolija para el entendimiento de la naturaleza metabólica de la vitamina D, especialmente de las formas activas, y durante ésta fueron fundamentales el grupo de Wisconsin que lideró DeLuca y el grupo del Strangeways Research Laboratory de Cambridge (Londres) liderado por E. Kodicek y E. M. Cruickshank. Uno de los primeros sensacionales avances lo realizó el grupo de DeLuca, donde participaron Blunt y Schnoes¹⁷¹, quienes en 1968 descubrieron que la vitamina D es hidroxilada a nivel del carbono-25 por el hígado para formar la 25-hidroxicolecalciferol (25-HCC). Durante algún tiempo los investigadores americanos pensaron que ésta era el metabolito final de la vitamina D, pero posteriormente se demostró que era el metabolito circulante que es transportado del hígado por vía sanguínea al riñón.

El otro paso sensacional en el estudio del metabolismo de la vitamina D fue descubierto por el grupo de Cambridge, por Kodicek, Lawson y Wilson¹⁷², quienes demostraron en 1969, al observar el destino de la vitamina D al marcar doblemente la 25-HCC, que el carbono 1 –marcado con tritio– se perdía, al igual que el hidrógeno, y se introducía el oxígeno en esta posición. La sustancia deficiente en tritio se localizaba minutos después en las células intestinales, células óseas y en las células renales. Posteriormente, en 1971, esta sustancia se identificó como 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-DHCC) por

Lawson, Fraser, Kodicek, Morris y Williams¹⁷³ del grupo de Cambridge; por Holick, Schnoes y DeLuca¹⁷⁴ del grupo de Wisconsin y por Norman, Myrtle, Midgett, Nowickis, William y Popjak¹⁷⁵ del grupo de Riverside-Los Ángeles; los tres grupos demostraron que era en las células renales donde se producía la 1,25-DHCC¹⁷²⁻¹⁷⁵.

Fotobiología de la vitamina D₃

La piel es el órgano responsable de la producción de la vitamina D₃. Durante la exposición solar el 7-dehidrocolesterol (7-DHC o provitamina D₃), el inmediato precursor del colesterol, absorbe las radiaciones solares con energía entre 290 y 315 nm (radiación ultravioleta B o UVB), la cual causa la transformación de 7-DCH en previtamina D. Una vez formada, la previtamina D₃ sufre una isomerización inducida térmicamente por un período de pocas horas y se transforma en vitamina D₃¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Esta vitamina D₃ (colecalfiferol) se produce por síntesis fotoquímica, a partir del 7-DCH en la piel, tras su exposición a la luz ultravioleta. Otra fuente es la ergosterina de los alimentos que suministran vitamina D₂ (ergocalciferol), aunque algunos alimentos también contienen vitamina D₃. El colecalfiferol y el ergocalciferol difieren sólo en las cadenas laterales¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Una pobre exposición a la luz del sol o una mala absorción intestinal pueden ser factores que contribuyan a un déficit de vitamina D, conocido como hipovitaminosis D. La vitamina D no sustituida es en sí misma inactiva. La vitamina D₃ es translocada de la piel a la circulación, donde es transportada por una proteína unida de la vitamina D¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Por los factores mencionados anteriormente existe la hipovitaminosis D, pero lo que no se ha demostrado es una intoxicación por vitamina D o por una excesiva exposición a la luz en las zonas tropicales –ni en los huesos se ha logrado demostrar una acción por esta excesiva exposición–. La razón de ellos es que una vez se forma la previtamina D₃, por la acción de las radiaciones solares ultravioleta B, ésta se transforma en productos biológicos inertes como el lumisterol y el taquisterol. Además, la previtamina

D₃ que se origina en la piel y se transforma en vitamina D₃ y la vitamina D₃ que se genera por los alimentos se fotoisomeriza a suprasterol 1, suprasterol 2 y 5,6 transvitamina D₃¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Los requerimientos de la vitamina D para niños y adultos se inician con la exposición a las radiaciones solares^{176,180-183}. La porción B (290-315 nm) de la luz ultravioleta es alta en energía en el espectro solar y es la responsable de convertir el 7-dehidrocolesterol de la piel a la previtamina D₃¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Una vez formada la previtamina D₃, sufre un rearrreglo estructural para formar una vitamina D₃ más estable¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. El uso de protectores solares, por ejemplo con un factor de protección de 8, reduce la producción cutánea de vitamina D₃ en un 97,5%^{188,189}.

Existen una serie de factores que pueden alterar la producción cutánea de vitamina D₃, como la melanina (o bloqueador solar natural) que compite con el 7-DCH por los fotones UVB, por ello un incremento de la melanina cutánea disminuye la fotosíntesis de la vitamina D; esto se ha demostrado en las personas de origen afroamericano quienes necesitan mayor exposición solar para producir la misma cantidad de vitamina D₃ que los pacientes blancos¹⁹⁰. Otro factor que disminuye la concentración de 7-DCH en la epidermis está relacionado con la edad; una persona de 70 años o más produce menos del 30% de vitamina D, cuando tiene la misma exposición solar, que una persona joven, es decir, una persona de 70 años produce la cuarta parte de vitamina D que un joven de 20 años^{176-182,191-193}. Con el conocimiento del papel de las radiaciones solares y la producción de vitamina D, y a la falta de exposición de la luz solar como causa de raquitismo y la disponibilidad de suplementos de vitamina D, el raquitismo prácticamente desapareció de Estados Unidos¹⁹⁴⁻¹⁹⁸. En la década de 1960 los casos de raquitismo nutricional se consideraban ya como una enfermedad rara y se recordaban como una curiosidad médica. Pero a partir de 1970, y específicamente después de los noventa, se han publicado una serie de artículos relacionados con raquitismo nutricional; un grupo de investigadores de Wake Forest University, Winston-Salem en Carolina del Norte, prendieron las alarmas por el resurgimiento del raquitismo en niños de piel oscura y madres de origen afroamericano que amamantan a los niños de seis

meses a 1 año; además se sabe que la leche materna tiene menos vitamina D que la leche de vaca, de acuerdo con los estudios de Leerbeck y Sondergaard¹⁹⁹, Reeve y cols.²⁰⁰, Edidin y cols.²⁰¹ en 1980, O'Connor²⁰², Eugster y cols.²⁰³, Pugliese y cols.²⁰⁴, Sill y cols.²⁰⁵, Binet y Kooh²⁰⁶, Ryan²⁰⁷, Rosenberg y cols.²⁰⁸. Otro factor que se ha estudiado, sobre todo en las madres de piel oscura, es que estas producen menos vitamina D que las madres de piel blanca, por ello este resurgimiento del raquitismo nutricional en Carolina del Norte, Chapel Hill y en Auckland, para mencionar algunas publicaciones relacionadas como las de Kreiter y cols.²⁰⁹, Hartman²¹⁰, Blok y cols.²¹¹, Biser-Rohrbaugh²¹², Bishop²¹³, Holick²¹⁴, Bell y cols.²¹⁵ y Krall y cols.²¹⁶. Sin embargo la hipovitaminosis D también se ha descrito en los adultos en varias publicaciones, a partir de 1990^{183,210,214,217-222}. Es necesario estar alerta por el nuevo resurgimiento de la hipovitaminosis D, tema muy desconocido para el cuerpo médico y para la población en general.

Durante el invierno el ángulo del cenith del sol es más oblicuo y por ello muy pocos fotones de las radiaciones ultravioleta tipo B se extienden sobre la superficie de la tierra, esto trae como resultado que, durante el invierno, se produzca poca vitamina D en las latitudes por encima y por debajo de -35°²²³⁻²²⁵.

La latitud es otro de los factores implicado en una disminución de la síntesis de vitamina D. A una latitud de 42° N, en Boston, las radiaciones solares son incapaces de inducir la producción de vitamina D₃ en la piel entre los meses de noviembre y febrero. En Edmonton, Canadá, a 52° N, este período se extiende entre octubre y marzo. Esto ocurre también en los países del norte de Europa y Asia, donde el invierno es extremo y afecta especialmente a las personas mayores de 50 años^{176-178, 182}.

En los niños y en los jóvenes la producción cutánea, especialmente en la primavera, verano y otoño, de vitamina D se lleva a cabo adecuadamente y ésta se puede almacenar en la grasa como reserva durante los meses de invierno; en los ancianos la capacidad de producir vitamina D a través de las radiaciones solares se disminuye, al igual que su capacidad de almacenamiento para el invierno, por ello la hipovitaminosis D en estos países. Datos de

hipovitaminosis D también han sido informados en España por Aurelio Rapado y Manuel Díaz Curiel¹⁷⁷. Por ello se explica la teoría que propone que la piel se vuelve más blanca a mayor latitud, al tiempo que se explica la menor concentración de calcidiol en personas de piel oscura^{176-178,180}.

En algunas ciudades de latitudes más bajas como Puerto Rico (18° N), Buenos Aires (34° S) y los Ángeles (24° N), la producción cutánea de vitamina D₃ se produce durante todo el año¹⁸⁰.

Otro determinante que puede interferir en la producción cutánea de vitamina D son los bloqueadores solares, con factor mayor de 8, ya que pueden reducir hasta un 95% la producción cutánea de vitamina D₃, por ello se le puede recomendar a los ancianos, quienes tienen mayor sensibilidad a la producción de cáncer de piel por acción de las radiaciones solares, que tomen el sol durante 15 minutos antes de aplicarse el bloqueador solar¹⁷⁷.

La piel tiene gran capacidad para inducir vitamina D. La exposición del cuerpo en traje de baño a la luz solar que cause un mínimo enrojecimiento de la piel es equivalente a entre 10.000 UI y 25.000 UI de vitamina D oral. Una exposición del 6% del cuerpo, de una dosis suberitematosa mínima, es equivalente a la ingestión de 600 a 1.000 UI de vitamina D^{192, 226, 227}. Así, la exposición de dosis suberitematosa a la luz solar en manos, brazos, cara y espalda dos o tres veces por semana es adecuada para satisfacer los requerimientos de vitamina D^{192, 214, 227-232}. Un trabajo interesante realizado en Nueva Zelanda, por Reid, Gallanher y Bosworth²³¹ en 1981, con un grupo de residentes en guarderías, quienes se expusieron entre 10 y 15 minutos a radiaciones solares tres veces por semana, les produjo un incremento importante de los niveles de 25(OH)D. Chuck y cols.²³³ utilizando radiación ultravioleta B, en los cuartos de los niños en las guarderías, establecieron que los niveles de 25(OH)₂D₃ eran normales. Igualmente encontraron Koutkia y cols.²³⁴ con la exposición solar o la radiación ultravioleta B, en pacientes con mala absorción a las grasas y con enfermedad de Crohn, al mantener en forma efectiva un método para prevenir y tratar a los pacientes con deficiencia de vitamina D, como lo demostraron Chick y Huldschinsky^{51, 235}.

Los orígenes exógenos de vitamina D₂ (ergocalciferol) ó D₃ (colecalciferol), a través de los alimentos como fuente, realmente son pocos y aquellos alimentos ricos en vitamina D₂ ó D₃ no son de uso común en la dieta. La fuente exógena de vitamina D₂ ó D₃ son los pescados grasos, como las anguilas, arenques, jurel, atún, bonito, congrio, salmón, anchoas, caviar, bacalao seco y los aceites de pescado. En menor proporción la leche, el hígado, la yema de huevo y las margarinas, tienen vitamina D₂ ó D₃^{177, 236}.

En los Estados Unidos y en los países nórdicos se suele enriquecer con vitamina D la leche y sus derivados, cereales, harinas y, recientemente, zumos de frutas, con el fin de solventar las necesidades de vitamina D. En Argentina, México, Brasil y Colombia ya se encuentran también los alimentos enriquecidos con vitamina D²³⁶.

La vitamina D de origen exógeno se absorbe en el intestino por medio de las sales biliares y utiliza los mismos mecanismos para la absorción que otras grasas, tras su incorporación a los quilomicrones y su absorción por vía linfática^{176, 177}.

La vitamina D₃ es transportada al hígado, donde se produce su conversión a 25-hidroxicolecalciferol por la 25-hidroxilasa, y posteriormente se produce la hidroxilación en los riñones por la 1 α hidroxilasa y se genera la 1,25(OH)₂D₃, es decir, la forma biológicamente activa de la vitamina D¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

El 25-hidroxicolecalciferol o calcidiol funciona principalmente como una forma de almacenamiento y transporte para el metabolito activo. Se han identificado numerosos factores que inhiben o estimulan la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal, pero esta regulación está estrechamente asociada a los requisitos fisiológicos, principalmente por la PTH que incrementa la actividad de la enzima. Por ello, resulta evidente que la 1,25(OH)₂D₃ no es una vitamina, sino una verdadera hormona, porque se produce en el organismo y se mantiene bajo un estricto control fisiológico¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

La escuela de California-Riverside y Anthony W. Norman

Anthony W. Norman nació en 1938, en Ames, en el seno de una familia conformada por una quí-

mica y un bioquímico, quienes lo estimulan al conocimiento de las ciencias en general. Estudió química en el Oberlin College, en Oberlin (OHIO), y se graduó de B. S. en junio de 1959, después de completar su aprobación por la American Chemical Society. Posteriormente se entrenó en bioquímica en la Universidad de Wisconsin; desde septiembre de 1959 hasta agosto de 1963, donde lo asignaron al laboratorio del gran investigador de la vitamina D Hector DeLuca. De él recibió ese gran entusiasmo por el estudio de la vitamina D. Posteriormente fue “silla” de bioquímica del departamento UC-Riverside, desde 1976 hasta 1981, y decano del programa UCR/UCLA Biomedical Sciences Program desde 1981 hasta 1991²³⁷.

Aportes de Anthony Norman y su segundo grupo

Las primeras publicaciones las realizó al lado de Hector DeLuca, en Madison, fue la primera vez que se marcó la vitamina D con una sustancia radioactiva como el tritio y con una actividad específica de 7.2 mC/mmole. De esta manera se podría, en el futuro, detectar el destino de la vitamina D *in vivo*²³⁸. Posteriormente, utilizando el método cromatográfico, lograron separar mezclas de vitamina D₂, ergosterol y taquisterol²³⁹. Durante su estadía en el laboratorio de DeLuca, el interés estaba relacionado con el énfasis para explicar las acciones biológicas de la vitamina D, a través de su interacción con las mitocondrias y la liberación de calcio y fosfato, pero esto no explicaba aún los mecanismos de acción de la vitamina D²³⁷. Tiempo después Norman estuvo en Amsterdam junto al profesor Slater y realizó un *postdoctoral fellow* con el profesor Paul D. Boyer en el departamento de química de la Universidad de California en los Ángeles²³⁷. Durante la década de 1960 se logró el descubrimiento de la fosfohistidina como una fosfoenzima intermedia. En el laboratorio de Boyer, Norman publica sus primeros artículos, en el *Journal of Biology Chemistry*, relacionados con el transporte de calcio en las mitocondrias y su interacción con la fosfohistidina mitocondrial^{240,241}. Luego se traslada a California-Riverside, al Departamento de Bioquímica, para continuar los estudios de los mecanismos oxidativos (OX-phos) relacionados con la vitamina D, uno de sus objetivos más importantes; sin embargo la competencia en estos estudios

era nada menos que la de sus maestros DeLuca, E. C Slater, B. Chance, E. Racker y P. D. Boyer²³⁷.

La tarea que emprendía Norman era titánica, ya que hasta 1963 sólo se habían publicado 200 artículos relacionados con la vitamina D, y entre 1970 y el año 2000 se han publicado 9600 artículos; desde 1990 se publican 950 artículos por año²³⁷. La pregunta de investigación que llevó a Norman y a su grupo a realizar una serie de aportes relacionados con la vitamina D fue su punto de partida, ¿cuál es la química de la vitamina D y su curso?, enfatizando que era un esteroide²³⁷. Al comienzo de la década de 1960 hubo un despertar en el campo de la endocrinología especialmente, en la comprensión de los mecanismos moleculares de la acción de las hormonas esteroideas, como el estradiol con los trabajos de Elwood Jensen²⁴² y Jack Gorski²⁴³ y el de la aldosterona por Isadore Edelman²⁴⁴. Gracias a estos trabajos Norman relacionó la acción de la vitamina D con los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas, una idea extraordinaria, ya que se adelantó a la explicación de los mecanismos de acción de la superfamilia de los esteroides a través de un receptor. Así, entre 1965 y 1966, escribe el artículo titulado “The mode of action of vitamin D”, que se publicó en *Biologic Review*²⁴⁵ en 1968. En él Norman explica que la acción de la vitamina D es como la de los estrógenos, aldosterona y progesterona, a través de un receptor, y que a la vez se regulaban los genes de transcripción que estimulan la producción de ARN y proteínas. Para la época en que Norman ofrece su explicación, se estaba desarrollando el conocimiento sobre ADN, ARN y la biología celular y molecular.

El siguiente paso de Norman fue seguirle los pasos a la vitamina D marcada con tritio. Empezó a utilizar pollos deficientes en vitamina D y analizó cómo era el transporte de calcio intestinal, a través de las trazas de la vitamina D tritiada, cuando se administraba una dosis fisiológica de vitamina D. Se observó que la radiactividad en el intestino blanco se encontró en el núcleo o en las fracciones de cromatina de las células. Norman pensó que esto debería ser un producto metabólico de la vitamina D y al que se encontraba en el núcleo lo denominó metabolito 4B. En el verano de 1967, Norman utilizó el metabolito 4B para analizar la actividad biológica con respecto a la absorción del calcio

intestinal en los pollos deficientes de vitamina D, la respuesta de los experimentos fue gratificante, ya que no sólo participaba en la absorción intestinal del calcio intestinal sino que era 50 veces más potente que el metabolito padre. Este metabolito hijo, 4B, se identificó posteriormente como $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. El artículo correspondiente se publicó en 1968 y se denominó “The association of a metabolite of vitamin D_3 with intestinal mucosa chromatin, in vivo”; en éste participaron M. R. Haussler, como primer autor, y J. F. Myrtle; fue editado por la *Journal Biologic Chemistry*²⁴⁶. Dos años después los mismos autores publicaron uno de los artículos clásicos de la historia de la vitamina D, titulado “Evidence for the biologically active form of cholecalciferol in the intestine”; este artículo fue seleccionado como un “Nutrition classic” y se reeditó en 1991 en la revista *Nutrition Review*^{247,248}.

Este artículo estimuló en forma importante al grupo de Riverside, y generó algún escepticismo en algunos científicos, pero concitó una competencia importante por el descubrimiento del metabolito polar de la vitamina D con E. Kodicek de Inglaterra y H. F. DeLuca de la universidad de Wisconsin-Madison. Además de la evidencia de Norman, Kodicek y DeLuca presentaron una similar de la existencia de un metabolito polar con alta actividad biológica²⁴⁹⁻²⁵². La preocupación de los tres grupos de investigadores fue el aislamiento y purificación química del metabolito 4B. Y así, en 1971, año crucial y muy significativo porque los tres grupos publicaron casi simultáneamente sus resultados, (Norman y cols.^{249,250} en *Science*, Kodicek y cols.²⁵¹ en *Nature* y DeLuca y cols.²⁵² en *PNAS*), se hace público el descubrimiento de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o calcitriol. Dos años antes Mark Haussler y Norman²⁵³ informaron el descubrimiento del receptor cromosómico para el metabolismo de la vitamina D en la revista *PNAS*, este artículo también fue seleccionado en 1985 para hacer parte de *Nutrition Review*²⁵⁴.

Cómo se origina la producción del calcitriol

En 1969 Norman conoce al profesor Jack W. Coburn, de la División de Nefrología de la Escuela de Medicina de la UCLA, quien promueve el interés de Norman hacia la clínica, generando con ello el concepto de aplicación de las ciencias básicas a la clínica

y resolver uno de los problemas clínicos: la enfermedad ósea asociada a la insuficiencia renal. Al conocerse la estructura del metabolito 4B en 1971, el grupo de Norman empezó a producir enzimáticamente el compuesto $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a través de algunas estructuras de los riñones de pollos; de ello se encargó June E. Bishop, quien purificó el compuesto $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que sirvió para tratar los primeros pacientes con insuficiencia renal y la osteítis fibrosa u osteodistrofia renal²⁵⁵. Durante tres años Coburn, Norman y una serie de investigadores del grupo trataron 60 pacientes con $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, producida por June Bishop en el laboratorio de Norman; incluso cinco miembros del grupo de Norman sirvieron de control²⁵⁶.

Posteriormente en 1973, Jack Coburn y Norman contaron con la suerte de ser invitados a Nutley, New Jersey, al laboratorio Hoffman-La Roche por el Dr. Neil Miller. Para su fortuna conocen al Dr. Milan Uskokovic, quien en ese momento había logrado la primera síntesis química de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²⁵⁷. Utilizando los datos clínicos de Coburn y Norman y la nueva molécula de Uskokovic se presentó a la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos para su aval como Investigational New Drug (I.N.D.), demorándose cuatro años más para ser aprobada; y finalmente la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ recibió el nombre comercial de ROCALTROL® para ser utilizada por los pacientes con osteodistrofia renal. Diez años después de ser aprobado en Estados Unidos, se aprobó en otros 17 países y posteriormente se empezó a utilizar en todo el mundo²³⁷.

Cómo se iniciaron los Workshop (talleres) sobre vitamina D

En 1973, Norman conoce al Dr. Klaus Schaeffer, nefrólogo de la Universidad Libre de Berlín en Alemania Occidental [antes de la caída del muro de Berlín (noviembre de 1989)], y al Dr. Hans G. Grigoleit del laboratorio Hoechst en Weisbaden. De la reunión de estos tres amigos nace la idea de organizar los Talleres sobre vitamina D. El primero se realizó en Weisbaden (Alemania) en septiembre de 1974. Estos talleres se llevan a cabo cada tres años y participan investigadores de Estados Unidos y de Europa Occidental, al primer taller, en 1974, asistieron 221 científicos. Los primeros siete talleres fueron organizados por Norman, Schaeffer y Grigoleit. A partir del octavo, que se organizó en 1991 en Pa-

rís, participaron otros co-organizadores, como el profesor Roger Bouillon de la Universidad Católica de Leuven (Bélgica), Monique Thomasset del INSERM de París y Anthony Norman. Estos talleres se continúan realizando hoy día.

Cómo se descubrió el receptor de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Durante la década de 1980, el dogma relacionado con el receptor de las hormonas de la superfamilia de los esteroides consistía en que éste se encontraba en el compartimiento citoplasmático y no estaba ocupado, después de ocuparse a través del ligando el receptor sufría una activación y se trastocaba hacia el núcleo²⁵⁸. El grupo conformado por Willi Hunziker, Marian Walters, June Bishop y Anthony Norman observaron que el receptor de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no se comportaba como el receptor de las hormonas esteroideas, sino que se encontraba en forma fisiológica en el 90% del núcleo y no se encontraba ocupado; a raíz de ello publicaron dos artículos, uno en 1980 y otro en 1983^{259,260}. Un año después Welshons y cols.²⁶¹ y King y Greene²⁶² en la revista *Nature* demostraron los mismos resultados que el grupo de Norman, pero con el receptor estrogénico a nivel nuclear y, además, no ocupado. El artículo de Norman y cols. relacionado con el receptor de $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ generó a los revisores de la *Journal Biologic Chemistry* varias inquietudes antes de publicarse, debido a que este grupo estaba cambiando el dogma que existía sobre el receptor de las hormonas esteroideas²³⁷.

Cómo se descubre la calbindina-D

Uno de los problemas más complejos era determinar cómo se realizaba el transporte intestinal del calcio a través de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Un discípulo de Norman, John Putkey, observó cambios en la composición proteica y en el interior de las estructuras de la fluidez, de la membrana lipídica y del borde en cepillo del intestino de los pollos, hasta conseguir la clonación de la calbindina-D, en 1983. Los resultados se plasmaron en varias publicaciones²⁶³⁻²⁶⁵. Posteriormente se demostró que la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inducía la síntesis de la calbindina-D, proteína que participa en forma dinámica en la translocación del calcio a través de las células epiteliales intestinales²⁶⁶.

Receptores de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en otros tejidos

En la década de 1970 y de 1980 se fueron conformando otros grupos de investigación en el campo de la hormona D, ya que se había descrito el receptor de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y se empezaron a consolidar los conocimientos y a comprender a nivel bioquímico y molecular el sistema endocrino de la hormona D; se pensaba que la actividad biológica de esta hormona se limitaba al intestino, hueso y riñones. Este concepto empezó a modificarse con el descubrimiento del receptor de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el páncreas, por Sylvia Christakos del grupo de Norman²⁶⁷ en 1981. Con ello se generó otro concepto: la distribución del receptor nuclear para $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ puede darse en diferentes tejidos y que la respuesta biológica a la hormona D [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$] puede ocurrir en cualquier célula que tenga un receptor nuclear²³⁷.

Otras funciones de la hormona D

Con el descubrimiento del receptor de la hormona D en el páncreas se planteó la posibilidad de nuevos mecanismos fisiológicos: Norman y Gerald M. Grodsky, de la Universidad de San Francisco, observaron que la deficiencia de la hormona D alteraba la secreción de insulina en respuesta a un secretagogo²⁶⁸. Con Seizo Kadowaki y con Cristina Cade demostraron que la secreción de insulina no se debe a la hipocalcemia causada por la deficiencia de la hormona D, sino que al administrarse la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, puede restaurarse la secreción de insulina en respuesta a un secretagogo, en las ratas deficientes de la hormona D²⁶⁹⁻²⁷².

Flexibilidad de la hormona D

Desde 1972 Norman y el profesor William H. Okamura, del Departamento de Química de la Universidad de California-Riverside, autoridad mundial en la química de la vitamina D, realizaron varios estudios colaborativos dedicados al estudio de la estructura y función de los metabolitos y análogos de la hormona D. Con los trabajos que realizaron demostraron que la estructura conformacional de la hormona D era bastante flexible y por ello sus funciones biológicas eran tan diversas, ya que la topología de la hormona D tiene varias formas en solución, diferente a la única forma de las hormonas esteroideas clásicas. Estos artículos se publica-

ron en *Science* y *PNAS* en 1974^{273,274}. Una estructura flexible se debe a: 1) la estructura del anillo de ciclohexano-A que puede girar fácilmente de acuerdo con la orientación 1α -OH a nivel ecuatorial y axial, miles de veces por segundo; 2) la rotura a nivel del carbón simple 9,10 que genera la vitamina D y sus metabolitos, permitiendo girar 360° alrededor del carbón 6,7; y 3) el carbón 8 de la cadena lateral. Esto permite que la unión de la hormona D y su receptor se puedan adaptar en los diferentes tejidos^{275,276}.

Otros metabolitos de la hormona D

Hasta 1975 se conocía que la hormona padre o la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ era solamente la encargada de la respuesta biológica, a pesar de que se conocía la existencia de por lo menos 20 a 25 metabolitos. Norman y la profesora Helen L. Henry empezaron a considerar que el segundo metabolito dihidroxilado producido en el riñón, el 24R, 25-hidrovitamina D_3 [$24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$], tenía que tener alguna función a nivel renal. Henry y Norman, al estudiar la $25(\text{OH})\text{D}$ - 1α hidroxilasa a nivel mitocondrial, demostraron que tenía un grupo heme en el citocromo P-450 y que esta enzima estaba presente en el riñón de todos los vertebrados, y qué papel desempeñaría en la regulación del metabolismo de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ y su conversión en $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²⁷⁷⁻²⁸¹. Después de estudiar los pollos y seguirlos durante un tiempo, observaron que huevos fértiles de los pollos que recibieron los dos metabolitos participaban en la madurez del huevo y en la madurez sexual de los pollitos, artículo que se publicó en *Science* en 1978²⁸². Posteriormente Norman y Eun-Gyoung Seo describen el receptor de la $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el callo de una fractura de la tibia del pollo y plantean, en un artículo publicado en 1997, la posibilidad de que los dos metabolitos, la $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ son necesarios para conservar la integridad normal del hueso y la cicatrización de las fracturas tibiales del pollo^{283,284}.

Cómo se describe la transcaltaquia

Hasta 1984 se consideraba que la respuesta biológica de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, era exclusivamente a través de su interacción con el receptor nuclear VDR nuclear. Norman y dos *postdoctoral fellow*, Ilka Nemere y Yoshio Yoshimoto, publican un artículo

que titularon “Calcium transport in perfused duodena for normal chicks in within 14 minutes of exposure to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ”. Ilka y Norman acuñaron una nueva palabra (transcaltachia-transcaltaquia), que quería significar la rápida estimulación hormonal del transporte del calcio intestinal. Con ello generan otro dogma: la respuesta rápida a la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que fue demostrada también por otros investigadores. Se concluyó que esta estimulación rápida del transporte de calcio intestinal no está mediada por el receptor VDR nuclear, generándose así el concepto de absorción genómica; si no media el receptor es la no genómica o transcaltaquia^{237,285,286}.

El interrogante en torno a esta observación era si existía la posibilidad de un segundo receptor, debido a la flexibilidad de éste. Contando con Bill Okamura y otros investigadores, el grupo de Norman purifica una proteína que se une a la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la membrana basal lateral del epitelio del intestino del pollo y que tiene relación con la transcaltaquia. Okamura, Norman y cols.²⁸⁷ sintetizan el análogo 6-S-cis o la 1,25-dihidroxipentadeuterio-previtamina D_3 que tiene una sola forma y es ser una agonista para la respuesta rápida, y no interactúa con el receptor nuclear VDR nuclear.

Papel inmunológico de la hormona D

Barbour, Coburn, Slatopolsky (de origen argentino), Norman y Horts publicaron en 1981, en el *New England Journal of Medicine*, el caso de hipercalcemia en un paciente anéfrico con sarcoidosis que producía altos niveles de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y por ello los niveles altos de calcio. Esto planteó la posibilidad de una producción no renal de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y que posiblemente ésta se generaba en los macrófagos²⁸⁸. Norman, Helmut Reichel y H. Philip Koeffler, que era profesor de oncología de la UCLA, empezaron a estudiar el metabolismo de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los macrófagos humanos activados. Para ello utilizaron el gama interferón y estimularon los macrófagos alveolares y los derivados de la médula ósea. Para sorpresa de los investigadores encontraron un incremento *in vitro* de los niveles de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Con ello demostraron que el sistema endocrino de la hormona D también requiere un sistema paracrino operativo, en los macrófagos, para producir $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^{237,289}.

Entre 1986 y 1996 Bill Okamura, Helen Henry, Phil Koeffler y Anthony Norman organizaron un trabajo en colaboración con el National Institutes of Health (NIH) para identificar algún medicamento que sirviera en el tratamiento de la leucemia, debido al efecto de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en las células hematopoiéticas, y de acuerdo con un trabajo que realizaron Norman, Phil Koeffler y Munker en el que demostraron proliferación clonal y diferenciación de las células mieloides humanas²⁹⁰. El objetivo del grupo era estudiar un análogo de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que inhibiese la proliferación de las células leucémicas sin ocasionar hipercalcemia. Utilizaron un análogo desarrollado por Milan Uskokovic, el compuesto $1\alpha,25(\text{OH})_2-16\text{-ene-23-yne-D}_3$ ó [Ro-23-7553] conocido como el análogo V²⁹¹. Se realizaron algunas publicaciones, en 1990 en *Cáncer Research*²⁹¹, en las que se informa un aumento de la sobrevivencia de los ratones leucémicos²⁹². En 1994 una compañía de biotecnología selecciona al análogo V como candidato para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, pero la compañía entra en una crisis financiera y por ello no pudo llevar a cabo los estudios²³⁷.

Endocrinología molecular

Uno de los investigadores básicos que se preocupó por transformar la endocrinología clásica en endocrinología molecular fue Anthony Norman. Él contó con la colaboración del profesor Gerry Litwack, del Jefferson Medical School, y juntos escribieron entre 1979 y 1986 18 capítulos, es decir tres capítulos por año, de un libro que se denominó *Hormones*. La segunda edición, mejor revisada y actualizada, se publicó en 1997. En este libro se recopilan todos los desarrollos de la endocrinología molecular: un sueño plasmado después de trabajar durante más de 30 años en el campo de la hormona D^{237,293}.

A continuación describiremos en una forma más amplia la participación de otros grupos en las diversas etapas del conocimiento y desarrollo de la hormona D.

Origen del calcidiol y calcitriol

Entre los artículos que precedieron el descubrimiento del calcidiol y del calcitriol se encuentran el de Windaus y cols.^{101,102} de 1936 y el de Schenck¹⁰³

de 1937, quienes aseguraban que la vitamina D actuaba en el organismo sin ninguna modificación. Esta aseveración se reforzó con los trabajos de los investigadores de Cambridge Cruickshank y Kodicek^{104,105}, quienes aseguraban que la vitamina D se metabolizaba antes de ejercer su función; al administrar dosis nociva de vitamina D y observar que sólo un 20% se metabolizaba mientras que el resto se encontraba en forma inactiva pero capaz de inducir calcificación, concluyeron que la vitamina D se debía metabolizar a productos inactivos¹³⁹.

En 1955 Kodicek y sus colaboradores^{105,294,295} sintetizaron la vitamina D₂, pero por la baja actividad específica del material que se utilizó, de tipo radiactivo, no lograron detectar biológicamente metabolitos activos de la vitamina D. Después de mejorar el tipo de material radiactivo y lograr la síntesis química de la vitamina D radiactiva en forma más específica, se logró un gran avance científico para entender el papel de los metabolitos polares de la vitamina D, especialmente por el grupo de Wisconsin: Norman y DeLuca^{238,296} en 1963-1964; Neville y DeLuca²⁹⁷ en 1966; Lund y DeLuca²⁹⁸⁻²⁹⁹ en 1967; Imrie, Neville, Snellgrove y DeLuca³⁰⁰ en 1967; DeLuca, Weller, Blunt, Neville³⁰¹ en 1968; quienes demostraron que este material biológico, marcado a dosis fisiológica, reveló en forma concluyente que la vitamina D, en efecto, se metabolizaba a metabolitos activos biológicamente, y se lograba detectar en sangre, hígado, hueso, intestino y riñones.

El primero de estos metabolitos fue identificado por Fraser y Kodicek³⁰²⁻³⁰⁴ en 1965, 1966 y 1970, y por Lund y cols.^{298,299} en 1967-1970 como un éster de la vitamina D y ácidos grasos de cadena larga. El segundo de los metabolitos es menos polar que la vitamina D₃, es biológicamente activo y aún no ha sido identificado. En la columna de ácido silícico se logró identificar como el pico VI, y tenía una actividad biológica como la vitamina D utilizada, pero actuaba mucho más rápidamente en la absorción intestinal de calcio; además, éste pico VI contiene una forma activa metabólicamente o una forma activa de la vitamina D, como lo plantearon Mor II, Lund, Neville y DeLuca³⁰⁵. Al introducir el método cromatográfico se facilitó el aislamiento del metabolito principal de la sangre y se identificó como 25-OH D₃ o Calcidiol por Blunt, DeLuca y

Schnoes³⁰⁶, en 1968, y por Blunt, Tanaka y DeLuca³⁰⁷, en 1968. Un año después, este mismo grupo lo sintetizó químicamente³⁰⁸, y Ponchon, Kennan y DeLuca, en tres artículos publicados en 1969, confirmaron que la 25-OH D₃ se sintetiza principalmente en el hígado³⁰⁹⁻³¹¹.

En ese mismo año Horsting y DeLuca³¹², utilizando segmentos de hígado perfundidos, demostraron que existía un sistema enzimático a nivel hepático que produce la 25-hidroxilación. Este sistema de hidroxilación es único y no es bloqueado por mezclas de monóxido de oxígeno y de la difenilparafenilendiamino.

La 25-OH D₃ o calcidiol es cerca de 4 veces más efectiva que la vitamina D₃, incrementa rápidamente la absorción intestinal del calcio e induce mayor movilización del calcio óseo.

Calcitriol

La síntesis del calcidiol por Blunt y DeLuca³⁰⁶⁻³⁰⁸ permitió preparar y marcar la 25-OH D₃ en las posiciones 26 y 27 y demostró que éste compuesto se metaboliza rápidamente a un material menos y más polar. Los compuestos menos polares representaban ésteres de la 25-OH D₃, pero los metabolitos polares que aparecían en la columna del ácido silícico en los picos V y VI se acumulaban rápidamente en el intestino, huesos y en otros tejidos. Haussler, Myrtle y Norman³¹³, en 1968; Ponchon y DeLuca³⁰⁹⁻³¹¹, en 1969; Lawson, Wilson y Kodicek¹⁷², en 1969: en ese orden demostraron la existencia de un metabolito de la [³H] vitamina D₃ más polar que la 25-OH D₃, que incrementaba el transporte intestinal del calcio.

El grupo de Cambridge, en el laboratorio de Kodicek^{294, 295, 314}, disponía de la vitamina D₃ marcada con tritio en la posición 1 α ; al realizar los diferentes experimentos, los investigadores observaron que el tritio, en la posición del carbono-1, se perdía completamente en un metabolito que aparecía en el intestino. Esta pérdida del tritio le hizo pensar a Lawson, Wilson y Kodicek¹⁷², en 1969, en un metabolito importante de la vitamina D en el intestino, y que está comprometido en la modificación de la posición del carbono 1. Ponchon y DeLuca³⁰⁹⁻³¹¹ detectaron este metabolito a nivel del hueso y del

intestino, pero su actividad biológica no se logró definir en esa época, debido a que no se disponía de tecnología más avanzada; sólo el laboratorio utilizaba la columna de ácido silícico, pero Holick y DeLuca³¹⁵ introducen la cromatografía de Sephadex LH-20 y la Sephadex G-25, y así fue posible clasificar los compuestos polares que se encontraban en el pico V de las muestras de sangre.

Como se mencionó anteriormente, el grupo de Kodicek^{294, 295, 314} logró demostrar que la pérdida del hidrógeno en el carbono-1 sugiere la introducción de un oxígeno en esta posición. Esta sustancia deficiente en tritio se detecta especialmente en el núcleo de las células intestinales, óseas y renales. Este grupo logra demostrar que la hidroxilación final del carbono-1 ocurre a nivel renal y se forma la 1,25 D.H.C.C del 25-HCC, como se demostró en 1971, en la publicación de Nature por Lawson, Fraser, Kodicek, Morris y William¹⁷³. De esta manera, dos escuelas importantes hacen las siguientes investigaciones: la de Wisconsin liderada por DeLuca³¹⁶⁻³¹⁸, descubre la 25-HCC o calcidiol, cuya enzima 25-hidroxilasa es una enzima microsomal y la 1 α hidroxilasa para la 25-HCC se encuentra en el riñón a nivel mitocondrial, originando el compuesto 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃) o calcitriol; el descubrimiento de este compuesto fue liderado por la escuela de Cambridge³⁰²⁻³⁰⁴, especialmente por Kodicek, desde 1970, cuando Fraser y Kodicek demuestran que dicho compuesto deficiente en tritio se sintetiza exclusivamente en el riñón.

Con la metodología que logran implementar Holick y cols.³¹⁵⁻³¹⁷, utilizando la columna de sephadex G-25, se pudo identificar también el compuesto polar de la vitamina D del intestino. Utilizando la anterior tecnología, la espectrometría de masa y algunas reacciones químicas, se logró establecer la estructura del metabolito, también por este grupo, como la (1,25(OH)₂D₃). La configuración α de este compuesto la realiza, un año después, este mismo grupo por Semmler y cols.³¹⁹; otro grupo como Haussler, Boyce, Littledike y Rasmussen³²⁰, en 1971, demuestra que la (1,25(OH)₂D₃) actúa más rápidamente que la 25-OH D₃ para iniciar el transporte del calcio intestinal; iguales observaciones hacen Myrtle y Norman²⁴⁹, en 1971, y Omdahl y cols.^{321, 322}, en

1971 y 1972. En ese mismo año Tanaka y DeLuca^{323,324} demuestran la movilización del calcio de los huesos a través de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Finalmente, se documenta claramente que el riñón es el sitio de la síntesis de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ya que ratas nefrectomizadas y deficientes en vitamina D no responden a la 25-OH-D_3 a dosis fisiológicas, pero sí responden a dosis $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, por lo que se demuestra que este compuesto es el metabolito final de la vitamina D, como lo demostraron Boyle y cols.^{325,326}, en 1971 y 1972, y Holick y cols.^{317,318}, en 1972.

Otros metabolitos de la vitamina D

Los otros metabolitos de la vitamina D_3 que se lograron aislar e identificar fueron la 24,25-dihidroxitamina D_3 [$24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$] y la 25,26-dihidroxitamina D_3 [$25,26\text{(OH)}_2\text{D}_3$]. Inicialmente la $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ fue identificada como $21,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ por Suda y cols.³²⁷⁻³²⁹, en 1970; posteriormente se logró demostrar que este metabolito es sintetizado por el riñón, especialmente en animales con una dieta rica en calcio y con cantidades normales en calcio. En otras circunstancias se puede sintetizar la $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$, cuando se reduce la síntesis de la $21,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ en las mitocondrias renales.

En ratas deficientes de vitamina-D se ha logrado observar un incremento de la síntesis de la $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$; este metabolito tiene cierta actividad en la movilización del calcio óseo e incrementa ligeramente la actividad del transporte del calcio intestinal. La $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ es el segundo metabolito de la vitamina D que se encuentra en el líquido extracelular y en los tejidos de los animales.

La $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ se aisló del plasma de los cerdos, al administrar una D_3 por Suda y cols.³²⁷, en 1970; también se ha logrado demostrar en el plasma de los pollos y en las ratas, cuando se administran dosis fisiológicas de la vitamina D. Tiene poca actividad biológica en la movilización del calcio de los huesos o en la absorción intestinal del calcio.

Tanto la 25(OH)D como la $1,25\text{(OH)D}$ sufren 24-hidroxilación para formar la 24,25-dihidroxitamina D [$24,25\text{(OH)}_2\text{D}$] y la 1, 24,25-trihidroxitamina D, respectivamente. Aun cuando se han identificado más de 40 metabolitos de la vitamina D, solamente la $1,25\text{(OH)D}$ ha demostrado ser la más

importante para casi todas las acciones biológicas de la vitamina D sobre el metabolismo del calcio y el metabolismo óseo, y los metabolitos $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$, $25,26\text{(OH)}_2\text{D}_3$ y la $1,24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ se consideran inertes desde el punto de vista biológico.

El sistema enzimático CYP

La vitamina D se puede generar a través de los nutrientes siendo transportada vía quilimicrones del intestino, vía linfática al hígado, mientras que la vitamina D que se obtiene de la piel se transporta principalmente por una proteína transportadora, parecida a la albúmina (DBP)^{176, 178, 236, 330,331}. Uno de los mecanismos fisiológicos que tienen los seres humanos cuando sufren una excesiva exposición a la luz ultravioleta es degradar la previtamina D en Lumisterol o taquisterol y otros esteroides que están exentos de actividad de la vitamina D; y cuando existe la ausencia congénita de la enzima funcional 7-dehidrocolesterol-7- Δ -reductasa, se produce una enfermedad grave denominada el síndrome de Smith-Lemli-Opitz, en la que existe una deficiencia de colesterol y una excesiva producción de 7-dehidrocolesterol que genera un desarrollo cerebral anormal y malformaciones tisulares como paladar hendido y sindactilia; al llegar la vitamina D de los nutrientes o de la piel³³² al hígado y a otros tejidos, la vitamina D_3 se metaboliza a 25-OHD , probablemente por la enzima CYP 27^{176,179,182,133,332-336}.

Este esteroide, 27-hidroxilasa (EC 1.14.13.15), es una enzima multifuncional, responsable para la 27-hidroxilación del colesterol y de los precursores de las sales biliares como 5β -colestano- 3α - 7α - 12α -triol; esta es su función importante; la 25 o 24-hidroxilación de la vitamina D_3 o D_2 es su función menor³³⁵.

Esta enzima es codificada por un gen localizado sobre el cromosoma 2, pero su regulación y estructura del promotor no ha sido estudiada en detalle¹⁷⁶. Esta enzima se puede encontrar en otros tejidos diferentes al hígado, como el duodeno, glándula adrenal, pulmones y macrófagos. Leitersdorf y cols.³³⁷, en 1994, describieron una anomalía genética asociada a una deficiencia de la CYP 27, caracterizada por una xantomatosis cerebrotendinosa, que se identifica, además de lo anterior, por una sobrecarga de colesterol, aterosclerosis prematura y fracturas óseas por la presencia de huesos

“osteoporóticos”, asociada a bajos niveles circulante de 25-OHD. Actualmente se encuentra en estudio la proteína sérica multifuncional DBP, codificada por un gen en el brazo largo del cromosoma 4, en el humano. A esta proteína se le están analizando otras funciones¹⁷⁶.

La 25-OHD necesita promover otras funciones biológicas antes de ser capaz de interactuar con su receptor. Otra enzima crítica es la 25-OHD-1 α -hidroxilasa, que se encuentra localizada principalmente en el riñón, pero puede ser activada en otras células no renales como en los monocitos, después de activarse por el γ -interferon y la estimulación antigénica. Por lo tanto, no sólo en el riñón se encuentra la enzima 25-OH-D-1 α -hidroxilasa, sino también en los monocitos y se han detectado otras enzimas, que han sido identificadas y clonadas por el grupo de Montreal por St-Arnaud y Glorieux³³⁸, y por Kato³³¹, en Tokio. Este gen de la CYP1 se encuentra localizado en el cromosoma humano 12q 13. Al parecer, Kato³³¹ demostró una mutación de la CYP, que es responsable en el humano del raquitismo tipo I, dependiente de la vitamina D. Otra hidroxilación alternativa de la 25-OH-D puede ocurrir en el carbono 24, por otro sistema enzimático multifuncional como la CYP 24, localizada en el cromosoma humano 20q 13¹⁷⁶.

Esta enzima CYP 24 no solo cataliza la 24-hidroxilación, sino que también puede inducir una deshidrogenación en los metabolitos de la vitamina D, como la 24,25-(OH)₂D y el 23-hidroxilato 24-keto, metabolitos de la vitamina D¹⁷⁶. También se ha descrito una alteración genética de la CYP 24 en el ratón: por el grupo de Montreal, liderado por St-Arnaud, en los ratones, ya que estos tienen un desarrollo prenatal normal, pero, posteriormente, tienen una alta mortalidad relacionada a una toxicidad de la 1,25-(OH)₂D^{176,338}. Este sistema CYP y los metabolitos de la vitamina D, apenas son un comienzo de lo conocido; es posible que existan otros mecanismos aún no conocidos, que pronto se puedan dilucidar.

La segunda enzima que se logró clonar, después de la 25-hidroxilasa, fue la 24-hidroxilasa, y se logró clonar a través de las mitocondrias del tejido renal, después de establecer una librería de cDNA del tejido renal de la rata, en 1991³³⁹. En 1993, se logró

clonar la enzima y se estableció el promotor del gene, entre 1993 y 1995, en el humano; se pudo establecer que la P450C24 puede catalizar la 24-hidroxilación de la 25ODH y de la 1,25(OH)₂D₃^{40,341}. Esta fue la primera evidencia de que todas las P450s mitocondriales están muy relacionadas y la enzima P450C24 puede inducir la conversión de 1,25(OH)₂D a 1, 24,25(OH) 3D. Por lo tanto, el catabolismo de la 1,25(OH)₂D está estrechamente regulado por la enzima CYP 24, la cual cataliza la 24, hidroxilación de la hormona, a varios productos de oxidación, que incluye la 1a,24,25-trihidroxi vitamina D, la que, al parecer, se considera un metabolito biológicamente inerte³⁴⁰⁻³⁴³.

Lo trascendental de este sistema enzimático CYP son los pasos que está dando el laboratorio Roche Holding AG en la investigación de los medicamentos “personalizados”, al estudiar el Amplichip CYP 450, que se puede encargar de analizar cómo responderá un paciente al utilizar fármacos antidepresivos, o codeína. Por lo tanto, el futuro de los chips CYP 450 u otros es bastante halagüeño.

El receptor de la vitamina D (VDR)

Al metabolizarse la vitamina D, ésta es dihidroxilada y se hace un poco más hidrofílica, pero la hormona sigue siendo lipofílica; por ello esta actúa como si fuese una hormona esteroidea, y el mecanismo es similar a los estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroideas; es decir, las células blancas para la vitamina D contienen un receptor nuclear para la vitamina D (VDR); para la 1,25(OH)₂D₃, este receptor tiene una afinidad 1000 veces mayor para unirse a la 1,25(OH)₂D₃, comparada con la 25(OH)D y otros metabolitos dihidroxilados de la vitamina D. Al interactuar la 1,25(OH)₂D₃ con el VDR, causa activación de la transcripción de genes específicos, cuyos productos están comprometidos en la estimulación de respuestas biológicas; algunas de estas funciones aún no se conocen, pero sí se conoce que el VDR forma un complejo con el receptor X del ácido retinoico (RXR) y se conforma un complejo heterodimérico con la 1,25(OH)₂D₃; una vez que se conforma este complejo heterodimérico (1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR) se fosforila el VDR e interactúan con los elementos de respuesta de la

Vitamina D (VDRE), ocasionando un aumento o una inhibición de los genes de la respuesta de la vitamina D, como la 25(OH)D-24-hidroxilasa (24-ohasa)^{176,344-347}.

De todas maneras, la interacción genera e induce la transcripción de una serie de genes e induce la síntesis de nuevos mRNA para producir una serie de proteínas. Entre las proteínas mejor caracterizadas, producidas por osteoblastos, están la osteocalcina, la osteopontina y la fosfatasa alcalina; en el intestino se produce la proteína unida al calcio (CaBP). La estructura del receptor de la vitamina D (VDR) está conformada por nueve exones, los cuales tienen un dominio unido al DNA en la región N-terminal y un dominio que se une a la hormona en la región C-terminal^{176,344-347}.

Se ha identificado que las mutaciones que se producen en los exones específicos provocan resistencia a la 1,25(OH)₂D₃, causando una especie de raquitismo dependiente de la vitamina D, tipo II³⁴⁸. Se ha descrito mutaciones en los exones y en los intrones que pueden señalar un polimorfismo en los genes del VDR; estos polimorfismos son importantes en la transcripción de los mRNA del VDR; hay algunas evidencias de que estos polimorfismos pueden generar respuestas diferentes a la 1,25(OH)₂D₃ en el intestino y en los huesos; por ello juegan un papel en la masa ósea pico y en el desarrollo de la osteoporosis. Algunos estudios como el de Morrison y cols.³⁴⁶, en 1994, demostraron que los genotipos homocigotos para el VDR, como los alelos bb, TT, tienen mayor densidad mineral ósea, pero Hustmyer y cols.³⁴⁷, en el mismo año, no encuentran esta asociación.

Sistema endocrino del calcitriol

La 1,25(OH)₂D₃ ó calcitriol es una hormona esteroidea; por lo tanto, actúa a nivel del intestino, a través de una vía genómica; parcialmente se describió al ligarse la hormona a un receptor. El complejo 1,25(OH)₂D₃-VDR (hormona D-receptor de la vitamina D (VDR) se une a una serie de secuencias reguladoras del ADN nuclear y controla la transcripción de mRNA específicos que controlan la síntesis de proteínas específicas como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, la osteopontina y, en el intestino, la

calbindina-D. Esta última promueve la absorción de calcio por difusión facilitada: ligamiento del calcio en el borde en cepillo (superficie luminal) que se incorpora a través de los canales del calcio o transportadores; posteriormente ocurre el traslado del complejo calbindina-D¹⁷⁶ calcio a la membrana basal, donde se transfiere el ion calcio a una bomba CaATPasa que lo lleva a la circulación; aun cuando el mecanismo exacto por el cual la 1,25(OH)₂D₃ altera el flujo del calcio a través de las células absorbentes intestinales, no es conocido, la 1,25(OH)₂D₃ incrementa la producción y actividad de varias proteínas en el intestino delgado, como la calbindina-D, la fosfatasa alcalina, la CaATPasa de baja afinidad, la actina del borde en cepillo, la calmodulina y las proteínas del borde en cepillo de 80 a 90 Kda, siendo la calbindina-D inducida por la 1,25(OH)₂D₃, una de las principales proteínas responsables para la alteración en el flujo de calcio, a través de la mucosa gastrointestinal^{176,178,179,181}.

Cuando se administra la 1,25(OH)₂D₃, por vía intravenosa, a animales deficientes de vitamina D, se produce una respuesta bifásica: una rápida, a las 2 horas, con un pico a las 6 horas, y una respuesta tardía, a las 12 horas, con un pico a las 24 horas; lo que sugiere que existen varios mecanismos implicados en la absorción intestinal del calcio. La 1,25(OH)₂D₃, además, incrementa la absorción de fósforo, pero la mayor absorción de fósforo ocurre en el yeyuno, ileon; la de calcio ocurre principalmente en el duodeno, aun cuando tanto el calcio como el fósforo se absorben a nivel del intestino delgado. La absorción del calcio intestinal tiene cierto control modulador a nivel citosólico, pero además se induce una serie de proto-oncogenes como el C-mic, C-fos y C-sis; especialmente incrementa la síntesis de la C-fos e induce una regulación de la proliferación y diferenciación celular; estas dos funciones se observan 1-2 horas después de la unión hormona-receptor; esta diferenciación y proliferación celular se traduce en un mejor perfeccionamiento de las funciones de las células de la microvellosidades. Como conclusión de las diferencias funcionales del calcitriol al incrementar la síntesis de calbindina-D, ésta incrementa el transporte transpitelial del calcio, la osteopontina induce una modulación del calcio intracelular y al incrementar la actividad de la 24-hidroxilasa, ésta modula el metabolismo óseo^{176, 178, 179, 181, 344,345}.

Transcaltaquia

Uno de los artículos clásicos de Norman³⁴⁸, en 1990, es la descripción de la transcaltaquia que es el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre el efecto no genómico que en transporte activo de calcio, al involucrar la apertura de los canales de calcio operados por el voltaje a través de la membrana intestinal, transporte vesicular de calcio asociado a la polimerización de microtúbulos, que ocasionan el tráfico rápido del calcio, a través de estas vesículas transportadoras de la vía no genómico se encuentra en el citosol, y sólo difiere del receptor del núcleo en que el dominio proteico diferencia los procesos que participan en la absorción del calcio; esto representa el primer paso para el ingreso del calcio de la dieta en los procesos fisiológicos que contribuyen al crecimiento esquelético, como la homeostasis del calcio a nivel intra y extracelular. Existe gran variabilidad en la ingesta de calcio, que oscila en el hombre entre 300-150 mg/día y se relaciona, a su vez, con las necesidades fisiológicas como el crecimiento, pubertad, adultez, gestación, lactancia, menopausia y andropausia, en la que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene un papel importante en los huesos^{176, 348, 349}.

La función del calcitriol, en los huesos, es aumentar la movilización del calcio almacenado, especialmente cuando el calcio de la dieta es inadecuado para mantener el sanguíneo en rangos normales. Uno de los investigadores en este campo ha sido Holick, que en el libro De Groot, Besser y Burger¹⁵⁵, publicado en 1995, describe cómo la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce a las células primitivas o Stem-cells en la médula ósea para que se produzca un proceso de diferenciación hacia osteoblastos. Una vez estas células se maduran, los osteoclastos pierden su capacidad para reconocer la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pero ellos sí tienen receptores para la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y, de una manera indirecta, producen una serie de citoquinas sensibles al osteoclasto, que le permite regular indirectamente la actividad osteoclástica.

Los osteoblastos maduros poseen receptores nucleares para la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y por ello esta hormona incrementa la expresión de fosfatasa alcalina, osteopontina, osteocalcina y una serie de citoquinas, cuyo efecto biológico importante es la mineralización

ósea¹⁷⁶. A pesar de la existencia de muchos artículos en los que se asigna un papel importante a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el proceso de la mineralización del hueso, dos de los más grandes estudiosos (como DeLuca¹⁷⁸ y Holick¹⁸⁰) sobre la vitamina D no han logrado mostrar evidencias claras de la participación del calcitriol en este proceso; pero sí está bien documentado el papel del calcitriol en promover la mineralización a través de la reserva del osteoide por los osteoblastos, al lograr mantener la concentración extracelular de calcio y fósforo en los rangos normales y el depósito de hidroxapatita en la matriz ósea.

Entre los genes dependientes del calcitriol, que participan en la homeostasis mineral, se encuentra la calbindina-D, para el transporte de calcio y fósforo; la bomba CaATPasa, en la membrana plasmática; la osteocalcina, en la síntesis de la matriz proteica del hueso; los genes de la $\alpha\text{v}\beta 3$ integrina, en la diferenciación de los osteoblastos; el gene del receptor VDR, en el metabolismo y sensibilidad de la vitamina D. En los riñones participan otros genes relacionados con el calcitriol, entre los cuales se encuentra la 24-hidroxilasa, cuyo efecto biológico es el metabolismo de la vitamina D y otras células endocrinas como las células C de la tiroides y las células paratiroides, así como también los genes que participan en la regulación de la paratormona y calcitonina, que mantienen el control homeostático del calcio, como hormonas calciotropas^{176, 178-181}.

Calcitriol, paratormona y masa renal

El descubrimiento de receptores de alta afinidad en la mucosa intestinal y en los riñones permitió establecer que la PTH como la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementan la reabsorción del calcio a nivel renal y, además, movilizan el calcio y el PO_4 de los huesos. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ controla una serie de funciones fisiológicas como la regulación de la síntesis y secreción de la PTH; por ello uno de los órganos blancos que más sufre son los riñones, especialmente en los pacientes con leve o moderada enfermedad crónica; y una de las primeras hormonas en disminuir los niveles es el calcitriol, cuando se empieza a reducir el tamaño de la masa renal^{176, 350}.

Esta reserva de calcitriol empieza a declinar, y por ende, los niveles de calcio, generándose de esta ma-

nera un hiperparatiroidismo secundario. La caída de los niveles de calcio a nivel plasmático, incrementa los niveles de PTH, ocasiona el aumento de las glándulas paratiroides y causa el hiperparatiroidismo secundario HPTS. Este HPTS causa retención de PO_4^{3-} , la cual reduce aún más el Ca^{2+} libre y reduce la actividad de la 1 α -hidroxilación, lo que produce una disminución de la 1,25-(OH) $_2$ D o calcitriol, conllevando a una disminución de la captación intestinal de Ca^{2+} ^{176, 350-353}.

Esta caída de la 1,25-(OH) $_2$ D sobre-regula la síntesis de PTH y compromete el efecto supresor del calcitriol sobre las glándulas paratiroides. Por ello en los pacientes con pérdida de masa renal HPTS, el beneficio significativo se obtiene al iniciar tempranamente el reemplazo apropiado de la hormona D³⁵⁰⁻³⁵⁴.

Estas dos hormonas se autocontrolan indirectamente, a través del ion calcio, de la siguiente manera: la paratormona (PTH) regula principalmente la producción renal de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ y, a la vez, ésta, al incrementarse, aumenta la absorción del calcio a través del intestino y del hueso: el incremento de los niveles de calcio contribuye a una disminución en la síntesis y producción de PTH; pero la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ también es reconocida por el VDR, que se encuentra presente en las células principales de las glándulas paratiroides; la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ disminuye la expresión de los genes de la PTH. En los pacientes que cursan con hiperparatiroidismo secundario y terciario pueden anidarse células que secretan PTH, que carecen total o parcialmente de los VDR, por ello se pierde parcialmente la respuesta de la PTH a los efectos de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Como conclusión, los efectos de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ o calcitriol que se utilizan en el tratamiento de la insuficiencia renal grave o moderada no sólo sirven para ayudar a mantener la homeostasis del calcio, sino que también ayudan para disminuir los riesgos ocasionados por el hiperparatiroidismo, como lo han demostrado varios grupos³⁵⁰⁻³⁵⁴.

En cuanto a la regulación del Ca^{2+} , la PTH es regulada en forma independiente por la 1,25-(OH) $_2$ D, la cual se une al VDR en las glándulas paratiroides. Un incremento en los niveles de 1,25-(OH) $_2$ D suprime la producción de PTH por reducir la transcripción de mRNA que codifica la prepro PTH e inhibe la proliferación de las células paratiroides³⁵⁴.

En sujetos normales, un incremento de los niveles de 1,25-(OH) $_2$ D y Ca^{2+} suprime la síntesis y liberación de PTH y mantiene niveles de Ca^{2+} en forma normal, en cambio el PO_4^{3-} en la regulación (downregulation) de la 1,25-(OH) $_2$ D y por una acción directa del PO_4^{3-} sobre las glándulas paratiroides, ocasiona un incremento en la síntesis de PTH³⁵⁴.

Cuando disminuye la masa renal en los pacientes con insuficiencia renal crónica, este balance se pierde y se produce un HPTS. La deficiencia de la 1,25-(OH) $_2$ D $_2$ y la hipocalcemia secundaria a la IRC producen una proliferación de las glándulas paratiroides y un incremento de la secreción de PTH; pero, a la vez, esto conlleva a una resistencia a la acción de la PTH, ocasionando la hiperplasia de las glándulas paratiroides^{354,218}.

Estos efectos de la PTH y de la hiperplasia de las paratiroides debido a la HPTS, producen unos efectos importantes en el hueso, ocasionando la osteítis fibrosa y la osteodistrofia urémica mixta, y todas las anormalidades histológicas observadas en lo que se denomina enfermedad ósea renal. Otro de los efectos de la PTH en órganos blanco no clásicos es el compromiso cardiaco, el cual puede inducir a una insuficiencia cardiaca, disfunción ventricular izquierda y alteraciones del metabolismo cardiaco. Además de lo anterior, se ha logrado documentar alteración de la secreción de insulina, neurotoxicidad, impotencia, alteraciones de la respuesta inmunitaria, alteración del metabolismo de los lípidos y las calcificaciones de los tejidos blandos.

Historia de los análogos de la vitamina D

1971 fue un año crucial, ya que tres laboratorios, simultáneamente, y con intervalos de semanas, informaron el descubrimiento de la 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$, la forma activa de la vitamina D: Norman y cols.^{250, 355,356}, DeLuca y cols.^{174,356}, Lawson y cols.¹⁷³. Comunicaron que la 25 hidroxivitamina D $_3$ (25OHD $_3$) es hidroxilada por los riñones, antes de que actúe como hormona en los tejidos blanco y sugieren que este metabolito es la 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$. Holick y cols.³⁵⁶ anuncian la identificación de la estructura de un metabolito altamente purificado del intestino como 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ y Norman y cols.²⁵⁰ informan la

identificación de una estructura química de un metabolito de la vitamina D como $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. Es decir, los tres grupos identificaron a la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ como el principio activo de la vitamina D. Posteriormente, Brumbaugh y Haussler³⁵⁷ descubren la existencia del receptor de la vitamina D en 1973 o (VDR). Kream y cols.³⁵⁸, del grupo de DeLuca, antes que el grupo de Norman, descubren la evidencia de un receptor nuclear para la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. Stumpf y cols.³⁵⁹ y Pike y cols.³⁶⁰ demuestran la ubicuidad del receptor VDR en muchos tejidos y se demuestra que la vitamina D actúa como una hormona esteroidea, y que expresa actividades biológicas a través de la unión a un receptor nuclear. Diez años después de analizar los efectos a nivel molecular de la hormona D, Abe y cols.³⁶¹, del grupo de Suda, notifican por primera vez la capacidad de inducir diferenciación celular por la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$; esto permitió que los químicos orgánicos, los biólogos moleculares, los endocrinólogos moleculares y la industria farmacéutica intentara separar las acciones calcémicas del calcitriol de sus acciones a nivel de la regulación del crecimiento celular y de la diferenciación. De esta manera, se pudieran utilizar análogos no calcémicos como medicamentos potenciales para el tratamiento de algunas enfermedades. Se describen históricamente tres generaciones de análogos.

La primera generación de análogos mimetiza o antagoniza la acción de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. Entre estos análogos se describe la $1\alpha \text{OH D}_3$, $1\alpha, 24(\text{OH})_2 \text{D}_3$, $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ -26, 27-F6- D_3 , 25-N-D_3 y la 25-F-D_3 .

Abe y cols.³⁶¹, al describir la capacidad de inducir diferenciación celular por la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, intentan modificar la estructura química de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ para evitar la regulación del calcio. Se inician las síntesis de varios análogos en forma cronológica: la $1\alpha, 25\text{S}$, 26-trihidroxi-22-ene-colecalciferol, en 1985, por Wovkulich y cols.³⁶²; el 22-oxacalcitriol (OCT; maxacalcitol), en 1986, por Murayama y cols.³⁶³; el MC-903 (calcipotriol) por Calverley y cols.³⁶⁴, en 1987; el 25-/26-análogo-homólogo de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ por Perlman y cols.³⁶⁵, en 1990; y la $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ -16-ene-26-Ynevitamina D_3 ³⁶⁶, en 1990. Abe y cols.³⁶⁷, en 1987, investigan la actividad biológica del OCT e informan que lograron separar la actividad calcémica de la que

induce la diferenciación; iguales hallazgos realizan Binderup y cols. con el calcipotriol, en 1988, y Okano y cols.³⁶⁹, en 1989. A partir de 1990 se ha logrado separar la actividad calcémica de la diferenciación celular; a través de los diferentes análogos de la vitamina D como, el MC-903 (calcitriol) y el OCT (maxacalcitol), aprovechando su acción en la diferenciación celular y su efecto antiproliferación celular, se empezaron a utilizar en el tratamiento de la psoriasis y el 19-nor- $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y el OCT, para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en pacientes sometidos a diálisis. Otros compuestos como la ED-71, producida por Chugai Pharmaceutical, se empezaron a utilizar para el tratamiento de la osteoporosis³⁵⁵, la EB-1089; por Leo Pharmaceuticals, para el cáncer de glándula mamaria³⁵⁵. Es tan grande el auge de los análogos de la vitamina D, en varios campos de la medicina, por la revisión de Bouillon Okamura y Norman³⁷⁰, en 1995; ellos reforman una lista de 280 análogos de la vitamina D. Los análogos antes mencionados se consideran como la segunda generación. A partir de 1995, se logran desarrollar nuevos análogos por varios grupos de investigación como los 3-epianálogos, por Nakagawa y cols.³⁷¹; los 18-nor- $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y el 19-nor OCT, por Okano y cols.³⁷²; el 2-metil-10-epi- $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, también del grupo Okano y cols.³⁷³ y los análogos de la vitamina D no esteroidea, por Bouillon³⁷⁴. Estos son los análogos de la tercera generación; los japoneses juegan un papel importante en el desarrollo de estos productos.

Análogos de la vitamina D

Utilización de los análogos de la vitamina D para el tratamiento de la osteoporosis.

Los análogos de la vitamina D se utilizaron primero que la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, en el tratamiento de la osteoporosis, ya que la multinacional japonesa Chugai Pharmaceutical, en 1981, desarrolló el $1\alpha \text{OH D}_3$ (que es una prodroga de la $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) como un producto farmacéutico para el tratamiento de la osteoporosis en el Japón, y se conoció con el nombre comercial de ALFAROL³⁵⁵, ya que en los pacientes con osteoporosis se ha logrado demostrar una mala absorción intestinal del calcio y una disfunción de la activación renal de la vitamina D; por ello, los Japoneses empezaron a utilizar la 1α

OH D₃; de todas maneras, a pesar de existir controversias con la utilización de la 1α, 25(OH)₂ D₃, esta hormona tiene su papel en el tratamiento de la osteoporosis, análisis que vamos ampliar en un capítulo posterior.

Otros análogos utilizados por los japoneses, como el OCT y la ED-71, son más potentes que la 1α, 25(OH)₂ D₃ en su capacidad para inducir diferenciación y la ED-71 es más efectiva que la 1α, 25(OH)₂ D₃ en el tratamiento de la osteoporosis. Tanto el OCT como la ED-71 son ocho veces más débiles en unirse al receptor VDR y la afinidad de la unión con la proteína transportadora de la vitamina D (DBP) es mucho más débil que la 1α, 25(OH)₂ D₃; en cambio, el ED-71 tiene mucho más fuerte la unión con DBP que la 1α, 25(OH)₂ D₃; esto permite que el OCT se acumule en los tejidos blancos como las glándulas paratiroides, intestino, glándulas adrenales y otros sitios, después que se administre; por ello tienen una gran capacidad de diferenciación y menos efecto calcémico³⁵⁵.

Otras aplicaciones del OCT

Chugai Pharmaceutical ha realizado una serie de investigaciones con el OYC para tratar el hiperparatiroidismo secundario en pacientes en diálisis y psoriasis, sin inducir hipercalcemia.

La historia se origina en 1989, cuando Brown y cols.³⁷⁵⁻³⁸⁰, del grupo Slatopolsky, mostraron que el OCT como la 1α, 25(OH)₂ D₃ tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de PTH, en cultivos primarios de células paratiroides de Bovinos; además, utilizando análisis de Northern, se demostró el efecto inhibitorio de OCT sobre extractos de RNA citoplasmáticos de glándulas paratiroides³⁷⁵⁻³⁸⁰. Después de varios estudios, este grupo, utilizando modelos en perros y ratas con falla renal, demostró la eficacia del OCT en la supresión de la paratormona in vivo; de esta manera, Chugai Pharmaceutical inició estudios de eficacia clínica del OCT en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario, en pacientes con diálisis, utilizando inyecciones I.V³⁸⁰. En esos estudios clínicos, los niveles de calcio se han mantenido por debajo de los niveles normales y el Koseisho japonés aprobó el OCT para utilizarlo en el hiperparatiroidismo secundario. También el

Koseisho japonés aprobó el unguento del OCT (maxacalcitol) para el tratamiento de la psoriasis³⁵⁵.

Actualmente Chugai Pharmaceutical se encuentra conduciendo estudios de fase I y II con el uso del ED-71 para el tratamiento de la osteoporosis³⁵⁵.

En el libro de Norman, Bouillon y Tomasset, Nishii y cols.³⁸⁰, en forma magistral, explican los aspectos stereo-estructurales de la 1α, 25(OH)₂ D₃, OCT y el ED-71; predicen la posibilidad de diferentes uniones a nivel del VDR por los diferentes análogos de la vitamina D, y que son diferentes a la unión de la 1α, 25(OH)₂ D₃ con su VDR, generando cambios conformacionales diferentes con los diversos análogos. Yamada y cols.³⁸¹ extendió el estudio a nivel del grupo 25-hidroxilo para unirse con el VDR y logró demostrar cinco regiones en la cadena lateral de los análogos de la vitamina D y observó que la zona F es importante en la diferenciación y en su capacidad hipocalcémica. Esto plantea la posibilidad de los diferentes mecanismos biológicos de estos productos y su potencial uso en muchas patologías.

Tadashi Kobayashi

Uno de los investigadores más importantes en los estudios de los análogos de la vitamina D es Tadashi Kobayashi, a quien en noviembre de 1997, en la primera conferencia internacional sobre química biológica de los análogos de la vitamina D, se le rindió un homenaje y un reconocimiento por impulsar la investigación de los análogos de la vitamina D^{355-382,383}.

Utilidad clínica de los análogos

Para corregir los efectos de la PTH y del HPTS, se empezaron a utilizar el calcitriol y los análogos de la vitamina D. El problema que surgió con el calcidiol y el calcitriol fue la asociación con la hipercalcemia. El desarrollo de estos análogos ha sido muy importante en los últimos años; para desarrollarlos se han tenido en cuenta todos los conocimientos relacionados con la hormona D; y el objetivo del desarrollo de estos productos era disminuir la hipercalcemia y la hiperfosfatemia. La elaboración y generación de estos productos se realizaron pensando en su acción sobre los VDR, su farmacocinética

que está relacionada, por su afinidad, a la proteína circulante unida a la vitamina D (DBP); pero también tienen un problema y es la vida media prolongada que restringe su acceso al VDR, su unión al receptor retinoide X y la conformación del complejo (análogo D-VDR-RXR) y su interacción con el DNA y la activación de los elementos de respuesta en el núcleo, es decir, los mismos mecanismos del calcidiol y del calcitriol^{348,385}.

El desarrollo de estos análogos es lograr restaurar los niveles de PTH a los valores normales, prevenir la hiperplasia de las glándulas paratiroides, mantener los niveles de Ca^{2+} y PO_4^{3-} y tratar de mantener una función normal, especialmente en aquellos pacientes con IRC y sometidos a diálisis³⁸⁴⁻³⁸⁶.

Entre los análogos de la vitamina D que se están descubriendo, se encuentran los siguientes: 24,25-(OH)₂D₃, el 22-oXA, calcitriol de la casa farmacéutica Chugai Pharmaceuticals; falecalcitriol de la casa farmacéutica Taisho/Sumitome Pharmaceutical Co, Ltda.; paracalcitol, o la 19-nor-1,25(OH)₂D₂ (Zemplar™ de la Abbott Laboratories); doxercalciferol 1α(OH) D₂ ó Hectoral™ Gelpcaps. Sólo se ha aprobado el paracalcitol y el calcipotriol (Dovonex)® Daivonex® en Chile y Colombia; el doxercalciferol se aprobó en la Unión Americana para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario sometido a diálisis³⁸⁴⁻³⁹⁰.

En modelos animales se ha logrado demostrar supresión de la PTH con pocos efectos sobre el calcio y el fósforo, pero aún se requieren más estudios. En otros estudios relacionados con dosis-respuesta se ha demostrado que la 19-nor-1,25 (OH)₂D₂ es 10 veces más potente en movilizar calcio y fósforo de los huesos que la 1,25(OH)₂D₃³⁸⁷⁻³⁸⁹.

En cuanto a la diferencia entre los análogos y la hormona D sobre sus efectos a nivel de los diferentes blancos, se tiene que está relacionada, ante todo, con la afinidad al DBP: existe una disminución de la afinidad al DBP, como se ha demostrado con la 22-oxa-1,25(OH)₂D₃ (OCT), que es 400 a 500 veces menos afín con la DBP; por ello, la vida media es más corta y se depura más rápidamente de la circulación; además, el DBP disminuye el acceso del análogo a los tejidos blancos y, por ello, ayuda a evitar la intoxicación con la vitamina D. Normalmente, la hormona D es metabolizada por la 24-hidroxilasa:

al modificarse las cadenas laterales de los análogos, se modifica la tasa de catabolismo; los análogos de la hormona D, al unirse a su blanco en los tejidos, pueden permanecer más tiempo en éstos y, de esta manera, se compromete el metabolismo de la hormona D. También se ha demostrado que los análogos tienen menor afinidad al receptor VDR como se observó con el OCT, que es 8 veces menos afín al receptor VDR que la 1,25-(OH)₂D₃³⁸⁴⁻³⁹⁰.

En el núcleo, al conformarse el heterodimero con el receptor VDR, y el RXR con los elementos de respuesta a la vitamina D o VDRE, este complejo activa a varios coactivadores, mientras que la OCT o los otros análogos sólo reclutan un subgrupo de coactivadores. Como estos análogos tienen poco tiempo de haberse elaborado, es necesario esperar otros años para entender mejor sus mecanismos; pero, por ahora, su mejor aplicabilidad es en el hiperparatiroidismo secundario y en la psoriasis³⁸⁴⁻³⁹⁰.

En un reciente trabajo publicado en el *New England Journal of Medicine*, Teng y cols. utilizan el paracalcitol en un estudio comparativo con el calcitriol en pacientes sometidos a un tratamiento con hemodiálisis y analizan la mortalidad a 36 meses de seguimiento. Observaron una reducción de la tasa de mortalidad especialmente cardiovascular en un 18%, en el grupo del paracalcitol, comparado con un 22.3%, en el grupo de calcitriol. Esta diferencia de 4 a 5% es importante, pero se requieren más estudios para analizar mejor estos resultados³⁹¹⁻³⁹².

Hormona D y cáncer

En los últimos años se ha estudiado el papel de los análogos de la vitamina D₃, entre los que sobresalen el EB 1089, RO24-5531 y la 1α hidroxivitamina D₅. Actualmente estos compuestos se encuentran en la fase I de los ensayos para analizar la tolerancia y efectividad en varios tumores, aprovechando su acción genómica y no genómica, a través de la proteína quinasa C y sus implicaciones en los canales de calcio, induciendo un efecto importante en la diferenciación celular y en la proliferación celular. Por ello, se está estudiando su efecto en células leucémicas y en líneas celulares de cáncer de glándula mamaria, de colon y de próstata. Se requieren algunos años para analizar y comprender estos re-

sultados de la hormona D, pero ya se inició esta nueva era de dicha hormona³⁹²⁻³⁹⁹.

Hormona D y sistema nervioso

Se considera que la suplenencia de la 1,25-(OH)₂D₃ era dependiente de la concentración de 1,25-(OH)₂D₃, pero recientemente se ha logrado demostrar la localización de la vitamina D₃ 25-hidroxilasa y la 25-hidroxivitamina D₃ α-hidroxilasa en el tejido cerebral. La presencia de estas enzimas en el cerebro permitió el estudio de la bioactivación de la prohormona vitamina D₃, como se estableció en los cultivos de las células de la microglia en la producción de la 1,25-(OH)₂D₃ y sus precursores, también se logró establecer el catabolismo de la hormona a través de la 24-hidroxilasa⁴⁰⁰⁻⁴⁰⁹.

Acciones genómicas a través del receptor VDR y no-genómicas, a través de canales de Ca²⁺ y de algunas vías como la proteína kinasa y algún receptor en el plasmalema, son los estudios que se están realizando en animales de experimentación y en el humano. Se está llevando a cabo una serie de investigaciones sobre neuroprotectores e inmunomodulares. Actualmente se está generado una serie de estudios experimentales en animales, en la esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, neuropatía periférica en ratas diabéticas, inducido por estreptozotocina y en gliomas⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁹.

Estas investigaciones, que se están realizando a nivel experimental, pueden ser una caja de Pandora para los futuros estudios de la hormona D y sus análogos.

Calcitriol e inmunología

Hasta finales de la década de 1980 e inicio de la década de los noventa, se empezó a analizar el papel del calcitriol en algunos mecanismos inmunológicos, como la presencia del VDR en las células mononucleares periféricas, como lo demostraron Pillai y cols.⁴¹⁰ en los queratinocitos, en 1987, y Holick^{180,181}, en 1994 y 1995. En los estudios invitro con células mononucleares, al exponerse y estimular estas células con 1,25(OH)₂D₃, éstas se transforman en

macrófagos. Una de las áreas mejor estudiadas es la epidermis, cuyas células poseen VDR.

De acuerdo con los estudios de Pillai⁴¹⁰ y Holick^{180,181}, al utilizar la 1,25(OH)₂D₃ en cultivos celulares de queratinocitos humanos, esta hormona inhibe la proliferación y diferenciación de los queratinocitos; por ello, en 1988, Smith, Pincus, Donovan y Holick⁴¹¹ plantearon la posibilidad de utilizar estos compuestos para tratar aquellas enfermedades de la piel como la psoriasis y empezaron a utilizar análogos de la 1,25(OH)₂D₃ como el calcipotriol (Dovonex® y Daivonex®) y el Bionalfa®. Un año después de la publicación de Smith y cols.⁴¹¹, Kragballe y cols.⁴¹² empezaron a utilizar el compuesto análogo de la vitamina D₃, denominado MC 903, como precursor del Dovonex® y Daivonex® y el Bonalfa®.

Otro de los mecanismos interesantes relacionados con el calcitriol es que los linfocitos T y B no poseen receptores VDR, pero, al activarse, ellos expresan el receptor y responden a la 1,25(OH)₂D₃, de acuerdo a los primeros estudios desarrollados por Provvedine y cols.⁴¹³, en 1983. Los linfocitos T activos responden a la 1,25(OH)₂D₃ al disminuir la producción de IL-2 y también se ha demostrado que inhibe la síntesis de ADN y la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

Tanaka y cols.⁴¹⁴, en 1982, al utilizar la línea celular HL-60 derivada de células leucémicas promielocíticas y exponerla a cantidades fisiológicas de 1,25(OH)₂D₃, advirtieron que estas células adquirieron características bioquímicas y fisiológicas de los macrófagos. Por el efecto anti-proliferativo de la 1,25(OH)₂D₃, el grupo de Koeffler y cols.⁴¹⁵ intentó su uso para el cáncer de glándula mamaria y algunas leucemias, pero los resultados no fueron buenos y se presentaron recurrencias e hipercalcemias.

Vitamina D y músculo

Además de la función de la vitamina D sobre la homeostasis del calcio y del fósforo, equilibrio en el que participan la PTH y la calcitonina. Dentro de las acciones a nivel de los órganos blanco, el músculo es uno de ellos, y la hormona D tiene varias funciones sobre su metabolismo.

Desde la descripción del raquitismo y los diferentes tipos de osteomalacia como la nutricional, la enteropatía sensible al gluten, el síndrome de mala absorción y la relacionada con la insuficiencia renal crónica, se notó que uno de los síntomas predominantes era la debilidad muscular en todos ellos, como una de las características clínicas.

Se ha demostrado que el calcitriol ejerce varios efectos sobre los sistemas transportadores y los canales iónicos de la membrana plasmática y retículo sarcoplásmico que modulan la homeostasis intramuscular del calcio y, de esta forma, sobre la interacción de los miofilamentos en la contracción y relajación muscular. Al parecer, el calcitriol participa en el flujo de fosfato a través del sistema co-transportador $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{3-}$ del sarcolema del músculo, promoviendo la síntesis de ATP en las mitocondrias, y participando como un factor regulador del crecimiento muscular. Estos efectos de la vitamina D sobre el músculo son importantes para un buen equilibrio fisiológico; pero cuando se demuestra que existe un déficit de la hormona D, los parámetros cinéticos de la contracción y relajación se hallan alterados, lo que indica que la miopatía es un desorden de la función muscular por bajo déficit de vitamina D⁴¹⁶⁻⁴²⁷.

Pero, además de ello, se produce una alteración del calcio intracelular, y este ión regula la concentración y relajación muscular, debido a la captación de calcio dependiente de ATP, desde el citoplasma al lumen del retículo sarcoplásmico, y la extrusión de calcio, desde el citoplasma celular; llevados a cabo por la ATPasa, funcionan lentamente, lo que explica el retardo en la velocidad de relajación; también se ha demostrado una disminución de los niveles de proteínas contráctiles como actina y troponina C cuando existe deficiencia de vitamina D y un defecto en la captación de fosfato, lo que implica una disminución de los niveles de ATP y, por ende, se compromete la provisión de energía para la contracción muscular⁴¹⁶⁻⁴²⁷.

Formas de la vitamina D

La familia de la vitamina D está conformada por 9 a 10 secosteroides, la cual difiere por la estructura de las cadenas laterales. Se han clasificado en cinco formas: vitamina D₂ o ergosterol; D₃ ó colecalciferol;

D4 o la 22,23-dihidroergocalciferol; la D5 ó sitosterol ó 24-etilcolecalciferol y la D6 o stigmasterol. También se ha aislado aproximadamente 400 análogos de la vitamina D₃ que se han sintetizado para evaluar su eficacia y su toxicidad.

Otros efectos biológicos de la hormona D

1. Glándulas paratiroides

- a. Reduce la síntesis y la secreción de la PTH
- b. Inhibe la proliferación de las células de las glándulas paratiroides

2. Intestino

- a. Incrementa la absorción de calcio y fosfatos

3. Hueso

- a. Participa en el desarrollo y el mantenimiento de la mineralización del hueso normal y el remodelamiento óseo

4. Músculo cardiaco

- a. Efectos antiproliferativos y prodiferenciación
- b. Mejoría de la función ventricular

5. Músculo esquelético

- a. Efectos proliferativos y prodiferenciación
- b. Mejoría de la debilidad muscular y de la atrofia observada en los pacientes con deficiencia de vitamina D

6. Hematopoyesis

- a. Diferenciación de células inmaduras
- b. Mejoría de la anemia

7. Piel

- a. Efectos antiproliferativos y de proliferación en varios tipos celulares

8. Riñones

- a. Reduce la síntesis de calcitriol
- b. Incrementa la reabsorción de calcio y fosfatos

9. Sistema nervioso central

- a. Mejora la regeneración del tejido neuronal

- b. Incrementa la síntesis del factor del crecimiento nervioso y de la neurotrofina

10. Hígado

- a. Incrementa la regeneración del tejido hepático.

11. Páncreas

- a. Incrementa la síntesis y liberación de insulina.

12. Tejido reproductor

- a. Mejora la fertilidad
- b. Efecto antiproliferativo en el útero y en el endometrio
- c. Aumenta la espermatogénesis y la función de las células de sertoli en los testículos

Vitamina D y salud ósea

La vitamina D participa en todas las etapas de la vida del ser humano, desde el embarazo, lactancia, niñez, etapa prepuberal, adolescencia, adultez, menopausia, andropausia y tercera edad; pero se carece de los estudios en todas estas etapas de la vida; sólo existen algunos estudios relacionados con la salud ósea y las diferentes etapas de la vida^{428, 429}.

Uno de los pocos informes sobre recomendaciones para la salud ósea es el de Bess, Dawson-Hughes⁴²⁸ de Tufts University, quien en Osteoporosis Internacional, en el suplemento publicado en 1998, describe que, en 1997, the National Academy of Sciences y el Institute of Medicine en la Unión Americana revisaron lo relacionado con los requerimientos sobre calcio, magnesio, fósforo, fluoruro y vitamina D. Analizaron conceptos de requerimiento promedio estimado y especialmente la dieta permitida y recomendada definida, como los requerimientos de los nutrientes que satisfagan las funciones de las diferentes etapas de la vida. Elaboraron una tabla entre la ingestión adecuada, lo recomendado y los límites tolerables^{428, 429-433} (tabla 1).

De acuerdo con la evaluación del Standing Committé on Scientific Evaluation of Dietary Reference Intake, concluyen que es más apropiada

la dosis adecuada, ya que existen limitaciones a estas recomendaciones en lo relacionado con el contenido de vitamina D de los alimentos y la variabilidad de la exposición solar en los diferentes países, de acuerdo al invierno⁴²⁸.

Vitamina D y salud ósea a través de la vida

1. Embarazo. Durante el embarazo, ocurre un incremento en la absorción del calcio a partir del primer trimestre, producto de una mayor absorción intestinal e incremento de la filtración glomerular. Este incremento de la mayor absorción intestinal del calcio en el primer trimestre se debe a la mayor actividad de la producción renal de 1,25-dihidroxitamina D, y este incremento del calcitriol está relacionado con el incremento de ciertas hormonas como la PTHrp (proteína relacionada a la paratormona), prolactina, estradiol y el lactógeno placentario^{349, 434}.

Se han informado en la literatura algunos casos de osteoporosis regional de caderas, en la que se sugiere que existe una resorción excesiva, bajos niveles de calcio y de vitamina D, o un incremento de la PTHrp. La incidencia de este tipo de patología es bastante rara. Kovacs⁴³⁵ ha demostrado en los estudios experimentales que la deficiencia materna de vitamina D produce pérdida de masa ósea al final del embarazo. Se recomienda una ingesta de vitamina D de 200 UI durante el embarazo; en algunos países que tienen un invierno con elevadas latitudes se ha descrito deficiencia de vitamina D y en estos casos se sugiere una buena suplementación de vitamina D.

2. Lactancia. En muchas publicaciones se ha afirmado que la baja concentración de calcio en la leche materna podría estar influenciado por los niveles de vitamina D, pero estas afirmaciones no las pudo confirmar Prentice y cols.⁴³⁶, en 1997. A diferencia del embarazo, durante la lactancia, la absorción intestinal del calcio disminuye y esta reducción coincide con los niveles de 1,25-dihidroxitamina D a valores prenatales; también se produce una reducción de la filtración glomerular, con la que se reduce la excreción renal del calcio en 24 horas.

Tabla 1. Requerimientos de la vitamina D

Edad	Dosis adecuada UI (ug/día)	Dosis recomendadas IU (ug/día)	Dosis tolerables máxima IU (ug/día)
0-6 meses	200 u ² (5ug)	300 u ² (7.5ug)	1000 u ² (25ug)
6 meses - 12 meses	200 u ² (5ug)	300 u ² (7.5ug)	1000 u ² (25ug)
1 año - 18 años	200 u ² (5ug)	400 u ² (10ug)	2000 u ² (50ug)
19 años 50 años	200 u ² (5ug)	200 u ² (5ug)	2000 u ² (50ug)
51 años - 70 años	400 u ² (10ug)	200 u ² (5ug)	2000 u ² (50ug)
71 y más años	600 u ² (15ug)	200 u ² (5ug)	2000 u ² (50ug)
Embarazo	200 u ² (5ug)	400 u ² (10ug)	2000 u ² (50ug)
Lactancia	200 u ² (5ug)	400 u ² (10ug)	2000 u ² (50ug)

Kovacs y Kronenberg⁴³⁷ demostraron un gran incremento de la actividad remodeladora ósea, y un incremento de los biomarcadores óseos, alcanzando niveles 2-3 veces superiores a los del tercer trimestre de embarazo. La pérdida ósea que ocurre en la lactancia sólo se puede revertir 3-6 meses después de terminar la lactancia.

3. Niñez. Uno de los problemas que tuvo la niñez hasta comienzos del siglo XX fue la deficiencia de vitamina D en el esqueleto en crecimiento que ocasiona un raquitismo carencial, como se analiza en esta historia. Existen grupos y razas con mayor riesgo de sufrir deficiencia de vitamina D, sobre todo aquellos que reciben una exposición disminuida de las radiaciones ultravioletas de acuerdo a:

a) Zona geográfica con latitudes altas (ejemplo: Mineapolis, Boston, New York, Norte de la unión americana, Canadá, Patagonia en Argentina)^{349, 434, 438, 439}.

b) Razones socioeconómicas, culturales y religiosas que impiden que niños pequeños y mujeres embarazadas se expongan al sol^{349, 434}.

c) Prematuros y primeros dos años de edad^{349, 434}.

d) En algunos países como en China y en el continente Africano se ha observado raquitismo con

ingesta de calcio entre 90 mg y 300 mg/día, a pesar de un adecuado nivel de vitamina D^{349, 434, 440, 441}.

e) En algunos casos se requiere evaluar el estado nutricional de la vitamina D, y este se analiza de acuerdo a los niveles circulantes de 25-hidroxivitamina D. De acuerdo a las series estudiadas, el riesgo de desarrollar raquitismo varía cuando los niveles de 25-hidroxivitamina D oscilan entre 8 y 12 ng/ml^{349, 434}.

Argentina es el país que más ha estudiado el raquitismo carencial hasta los 14 años, especialmente en la Patagonia y específicamente en Ushuaia, por la doctora Beatriz Oliveri y su grupo. El grupo de Oliveri y cols.⁴⁴²⁻⁴⁴⁵ demuestra que el raquitismo carencial se incrementa a medida que se aumenta la latitud. Los estudios practicados en Ushuaia (Tierra del fuego, a 55° sur), mostraron que aproximadamente el 50% de los niños sanos, de 7 años en promedio, tenían niveles séricos disminuidos en el invierno, de 25-hidroxivitamina D, menores a 8 ng/ml, y esa variación estacional de hormona paratiroidea con niveles mayores en el invierno. Este grupo también evaluó la suplementación con una dosis de vitamina D, al principio del otoño, de 150.000 UI que aumenta los niveles de 25-hidroxivitamina D al final del invierno, en forma significativa, comparado con los niños sin

suplementación; además, la suplementación disminuyó los niveles de PTH⁴⁴²⁻⁴⁴⁵.

4. Pubertad y adolescencia. El depósito de calcio en el esqueleto es muy acentuado en la pubertad. Para que se produzca este depósito, se requieren varias hormonas como la del crecimiento, IGF-1, esteroides sexuales, hormonas tiroideas y el calcitriol, promoviendo el influjo y la retención del calcio. Al final de la segunda década se alcanza el 90-95% del pico de masa ósea y se termina al final de la tercera década. Este pico está determinado por la combinación de factores endógenos (genéticos y hormonales) y factores exógenos como los nutricionales y la actividad física. Esta etapa es vulnerable para que se produzca una buena ganancia ósea, o para ser susceptibles a desarrollar una enfermedad metabólica ósea por un depósito inapropiado, por la constitución genética. El papel del calcitriol es fundamental para mantener la salud ósea^{349, 434, 446-450}.

5. Adultez. Varios factores hormonales, genéticos y ambientales se interrelacionan y pueden afectar la acumulación del tejido óseo hasta obtener el pico de masa ósea o su integridad durante la vida adulta. Dentro de los factores nutricionales, la deficiencia de calcio y de vitamina D, como también la de proteínas, perturban el crecimiento esquelético o aceleran su pérdida. Existen fuertes evidencias tanto para el calcio como para la vitamina D (derivada de la piel o de origen exógeno) para preservar la masa ósea durante la adultez. El calcitriol es importante para el mantenimiento de la integridad ósea durante la adultez. Su déficit severo y prolongado puede producir la osteomalacia, que se expresa bioquímicamente por una disminución del calcio y fósforo séricos o con un incremento de la fosfatasa alcalina. Nuestra experiencia y deseo es detectar aquellos casos sub-clínicos en esta etapa, ya que puede detectarse un hiperparatiroidismo relativo. Hemos detectado este grupo de pacientes, pero casi siempre los valores del calcidiol y calcitriol son normales^{349, 434, 451}.

En esta etapa de la vida se ha llevado a cabo una serie de estudios como los de Carnevale y cols.⁴⁵² quienes demostraron una prevalencia de hipovitaminosis D en el sur de Italia, durante el invierno, y se demostró una prevalencia más pronunciada en mujeres jóvenes, con mayor índice de remodelamiento óseo. Zitterman y cols.⁴⁵³ analizan el efec-

to de la exposición solar en las diferentes estaciones sobre la absorción de calcio y el recambio óseo en un grupo de mujeres jóvenes, con el objetivo de determinar la necesidad de suplementar con vitamina D a este grupo etario. No encontraron modificación en los marcadores de recambio óseo y concluyen que, con una buena ingesta de calcio, no se requiere los suplementos con vitamina D.

En cuanto a la contribución del polimorfismo del VDR sobre la eficiencia de la absorción de calcio, los estudios realizados por Wishart y cols.⁴⁵⁴ y Kinyamu y cols.⁴⁵⁵ sobre ingesta de calcio, calcitriol y los genotipos del VDR demuestran que los polimorfismos de este gen tienen una influencia menor en la absorción del calcio; por lo tanto, es imposible demostrar claramente que los diferentes genotipos del VDR (BB-bb) interactúan con la ingesta de calcio alta o baja y contribuyen a la absorción del calcio; no se debe olvidar el papel de la acción no genómica en la absorción del calcio intestinal.

De las mujeres postmenopáusicas con osteoporosis, un 50% tiene mala absorción de calcio; esto genera una disminución en la concentración de vitamina D, una disfunción renal y una disminución de la sensibilidad gastro-intestinal al calcitriol, de acuerdo a los estudios de Wishart y cols.⁴⁵⁴ y Bolscher y cols.⁴⁵⁶, quienes demostraron que los estrógenos pueden estimular la absorción intestinal de calcio, independiente del calcitriol; Thomas y cols.⁴⁵⁷ demostraron la presencia de receptores intestinales a estrógenos.

A través de las diferentes etapas de la vida, se ha podido demostrar en los diversos estudios la importancia de la vitamina D en el mantenimiento adecuado de la salud ósea y que una falla por deficiencia de ella o por un defecto de su acción a nivel de los diferentes receptores de los diferentes tejidos blanco puede generar un defecto en el pico de masa ósea, ocasionando una osteopenia, raquitismo o una osteomalacia. De todas maneras es un hecho aceptado la relación existente entre la masa ósea y la carga genética de la población, a pesar de la existencia de estudios contradictorios, especialmente en lo relacionado con las implicaciones fisiológicas y terapéuticas en una patología tan frecuente como la osteoporosis.

Referencias

128. Orr W, Holt LE, Wilkens L, Boone FH. The calcium and phosphorus metabolism in rickets with special reference to ultraviolet ray therapy. *Am. J. Diseases Children* 1923; 26: 362-372.
129. Harris LJ. Vitamins. *Ann. Res. Biochem.* 1994; 3: 247-294.
130. Nicolaysen R. Studies upon mode of action of vitamin D. II. Influence of vitamin D on the faecal output of endogenous calcium and phosphorus in the rat. *Biochem. J* 1937; 31: 107-121.
131. Nicolaysen R. Studies upon the mode of action of vitamin D III. The influence of vitamin D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat. *Biochem J* 1937; 31: 122-129.
132. Nicolaysen R. Studies upon the mode of action of vitamin D IV. The absorption of calcium chloride, xylose and sulphate from isolated loops of the small intestine of calcium chloride from the abdominal cavity the rat. *Biochem J* 1938; 31: 323-328.
133. Nicolaysen R. Studies upon the mode of action of vitamin D V. The absorption of phosphates from isolated loops of the small intestine rat. *Biochem J* 1967; 31: 1086-1088.
134. Nicolaysen R. The absorption of calcium. *Acta Physiol Scand.* 1943; 6: 201-209.
135. Nicolaysen R, EEG-Larsen N. The biochemistry and physiology of vitamin D. *Vitamins Hormones* 1953; 11: 29-60.
136. Nicolaysen R, EEG-Larsen N. The mode of action of vitamin D. In: *Ciba Found. Symp. Bone structure and Metabolism*, edited by G.W.E. Wolstenholme and C.M.O. Connor. Boston: Little, Brown 1956; 175-186.
137. Nicolaysen R, EEG-Larsen N, Malm OJ. Physiology calcium metabolism. *Physiol Rev.* 1953; 33: 424-444.
138. Wilson TH, Wiseman G. The use of sacs of the everted small intestine for the study of the transference of substances the mucosal to serosal surface. *J Physiol (London)* 1954; 123: 116-125.
139. Schachter D, Rosen SM. Active transport of Ca⁴⁵ by the small intestine and its dependence on vitamin D. *Am J Physiol* 1959; 196: 357-362.
140. Omdahl JL, DeLuca HF. Regulation of vitamin D metabolism and function. *Physiological Reviews* 1973; 53: 327-372.
141. Wasserman RH, Kallfelz FA, Comar CL. Active transport of calcium by rat duodenum in vivo. *Science* 1961; 133: 883-884.
142. Wasserman RH, Taylor AN. The non-essentiality of sodium ions for intestinal calcium transport. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1963; 114: 479-482.
143. Schachter D. Vitamin D and the active transport of calcium by the small intestine. In: *The Transfer of Calcium and Strontium Across Biological, Membranes*, edited by R.H. Wasserman. New York: Academic 1963; 197-210.
144. Harrison HE, Harrison H. Transfer of calcium Ca⁴⁵ across intestinal wall in vitro in relation to action of vitamin D and cortisol. *Am J Physiol* 1960; 199: 265-271.
145. Harrison HE, Harrison H. Intestinal transport of phosphate: action of vitamin D, calcium and potassium. *Am J Physiol* 1961; 20: 1007-1012.
146. Krawitt EL, Schedl HP. In vivo calcium transport by rat small intestine. *Am J Physiol* 1968; 214: 232-236.
147. Rasmussen H. the influence of parathyroid function upon the transport of calcium in isolated sacs of rat small intestine. *Endocrinology* 1959; 65: 517-519.
148. Wasserman RH, Kallfelz. Vitamin D₃ and unidirectional fluxes across rachitic chink duodenum. *Am J Physiol* 1962; 203: 221-224.
149. Ussing HH. Some aspects of the application of tracers in permeability studies. *Advan Enzymol* 1952; 13: 21-65.
150. Walling MW, Rothman SS. Phosphate in dependent, carrier-mediated active transport of calcium by rat intestine. *Am J Physiol* 1969; 217: 1144-1148.
151. Walling MW, Rothman SS. Apparent increase in carrier affinity intestinal calcium transport following dietary calcium restriction. *Am J Physiol* 1970; 245: 5007-5011.
152. Martin DL, DeLuca HF. Influence of sodium on calcium transport by the rat small intestine. *Am J Physiol* 1969; 216: 1351-1359.
153. Martin DL, DeLuca HF. Calcium transport and the role of vitamin D *Arch Biochem Physiol* 1969; 134: 139-148.
154. Adams TH, Norman AW. Studies on the mechanism of action of calciferol. I. Basic parameters of vitamin D mediated calcium transport. *J Biol Chem* 1970; 245: 4421-4431.
155. Wasserman RH, Taylor AN, DeLuca F. Vitamin D₃ -induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 1966; 152: 791-793.
156. Wasserman RH, Corradino RA, Taylor AN. Vitamin D-dependent calcium-binding protein: purification and some properties. *J Biol Chem* 1968; 243: 3978-3986.
157. Wasserman RH, Taylor AN. Vitamin D-dependent calcium-binding protein: response to some physiological variables. *J Biol Chem* 1968; 243: 3987-3993.
158. Wasserman RH. Calcium transport by the intestine: a model and comment on vitamin D action. *Calcified Tissue Res* 1968; 2: 301-313.
159. Wasserman RH. Interaction of vitamin D-dependent calcium-binding protein with lysolecithin: possible relevance to calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 1970; 203: 176-179.
160. Wasserman RH, Corradino RA, Taylor AN. Binding proteins from animals with possible transport function. *J Gen Physiol* 1969; 54: 1145-1175.
161. Wasserman RH, Taylor AN. Evidence for a vitamin D₃ -induced calcium-binding protein in new world primates. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1971; 136: 25-28.
162. Mac Gregor RR, Hamilton JW, Cohn DV. The induction of calcium binding protein biosynthesis in intestine by vitamin D₃. *Biochim Biophys Acta* 1970; 222: 482-490.
163. Martin AL, Melancon MJ Jr., DeLuca HF. Vitamin D stimulated, calcium-dependent adenosine triphosphatase from brush borders of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 35: 819-823.
164. Haussler MR, Nagode LA, Rasmussen H. Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by vitamin D and identity with Ca-ATPase. *Nature* 1970; 228: 1199-1201.
165. Taylor AN, Wasserman RH. Correlations between the vitamin D-induced calcium binding protein and intestinal absorption of calcium. *Federation Proc* 1969; 28: 1834-1838.
166. Taylor AN, Wasserman RH. Immunofluorescent localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 107-115.
167. Fairbanks BW, Mitchell HH. The relation between calcium retention and the store of calcium in the body with particular reference to the determination of calcium requirements. *J Nutr* 1936; 11: 551-572.
168. Rottensten KV. CLXXI. The effect of body stores on the efficiency of calcium utilization. *Biochem J* 1938; 32: 1285-1292.

169. Norman DA, Fordtran JS, Brinkley LJ, Zerwekh JE, Nicari MJ, Strowig SM, Pack CYC. Jejunal and ileal adaptation to alterations in dietary calcium. Changes in calcium and magnesium absorption and pathogenic role of parathyroid hormone ad 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 1981; 67: 1599-1603.
170. Sakhaee K, Baker S, Zerwekh J, Poindexter J, García-Hernández PA, Pak CYC. Limited risk of kidney stone formation during long-term calcium citrate supplementation in nonstone forming subjects. *J Urol* 1994; 152: 324-327.
171. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry* 1968; 7: 3317-3222.
172. Lawson DEM, Wilson PW, Kodicek E. Metabolism of vitamin D. A new cholecalciferol metabolite, involving loss of hydrogen at C-1, in chick intestinal nuclei. *Biochem J* 1969; 115: 269-277.
173. Lawson DEM, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH. Identification of 1,25 dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature* 1971; 130: 228-230.
174. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca F. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D₃ metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 803-804.
175. Norman AW, Mytle JF, Midgerr RJ, Nowicki HG, Williams V, Popjak G. 1,25-dihydroxycholecalciferol: Identification of the proposed active form of vitamin D₃ in the intestine. *Science* 1971; 173: 51-54.
176. Holick MF. Vitamin D: Photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications In: *Primer on the of mineral metabolism*. Third edition. Editor Murray J Favus, chapter 13, 74-81, Lippincott. Raver, Philadelphia. New York.
177. Rapado Errazti A, Díaz-Curiel M. Hipovitaminosis D en España. Editado por FHOEMO, capítulo 1; 1-13.
178. DeLuca H. The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *Fed Proc Am Soc Wxper Biol* 1988; 2: 224-236.
179. Reichel H, Koefler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 981-991.
180. Holick MF. Vitamin D: New horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 619-630.
181. Holick MF. Vitamin D: Photobiology, metabolism, and clinical applications. In: DeGroot L, Besser H, Burger HG et al. (eds.). *Endocrinology*, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1995; 990-1013.
182. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet radiation. *Lancet* 1989; 4: 1104-1105.
183. Theiler R, Balthasar Stahelin H, Kranzlin M et al. Influence of physical mobility and season on 25-hydroxyvitamin D-parathyroid hormone interaction and bone remodeling in the elderly. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 673-379.
184. MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 1982; 216: 1001-1004.
185. Tian XQ, Chien TC, Matsuoka LY et al. Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D₃ in human skin. *J Biol Chem* 1993; 268: 14888-14892.
186. Tian XQ, Cehn TC, Lu Z et al. Characterization of the translocation process of vitamin D₃ from the skin into the circulation. *Endocrinology* 1994; 135: 655-661.
187. Malick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin poikilothermic animals. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 3124-3126.
188. Matsuoka LY, Ide L, Worstman J et al. Sunscreen suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1165-1168.
189. Matsuoka LY, Worstman J, Hanifan N et al. Chronic sunscreen use decreases circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D: a preliminary study. *Arch Derm* 1988; 124: 1802-1804.
190. Clemens TL, Henderson SL, Adams JS et al. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. *Lancet* 1982; 1: 74-76.
191. MacLaughlin J, Holick MF. Again decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 1985; 76: 1536-1538.
192. Holick MF. Vitamin D in health and prevention of metabolic bone diseases. In *Osteoporosis: Diagnostic and Therapeutic Principles*. Edited by Rosen C. Totowa, NJ: Humana Press 1996; 29-43.
193. Need H, Morris A, Horowitz H et al. Effects of skin thickness age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 882-885.
194. Weick MT. A history of rickets in the United States. *Am J Clin Nutr* 1967; 20: 1234-1241.
195. Harrison HE. The disappearance of rickets. *Am J Public Health* 1966; 56: 734-737.
196. Bachrach S, Fisher J, Parks JS. An outbreak of vitamin D deficiency rickets in a susceptible population. *Pediatrics* 1979; 64: 871-877.
197. Feldman KW, Marcuse EK, Springer DA. Nutritional rickets. *Am Fam Physician* 1990; 42: 1311-1318.
198. Rudolf M, Arulanantham K, Greenstein RM. Unsuspected nutritional rickets. *Pediatrics* 1980; 66: 72-76.
199. Leerbeck E, Sondergaard H. The total content of vitamin D in human milk and cow's milk. *Br J Nutr* 1980; 44: 7-12.
200. Reeve LE, Chesney Rw, DeLuca HF. Vitamin D of human milk; identification of biologically active forms. *Am J Clin Nutr* 1982; 36: 122-126.
201. Edidin DV, Levitsky LL, Schey W, Dumbovic N, Campos A. Resurgence of nutritional rickets associated with breast-feeding and special dietary practices. *Pediatrics* 1980; 65: 232-235.
202. O'Connor P. Vitamin D-deficiency rickets in two breast-feed infants who were not receiving vitamin D supplementation. *Clin Pediatr* 1977; 16: 361-363.
203. Eugster EA, Sane KS, Brown DM. Minnesota rickets. Need for a policy change to support vitamin D supplementation. *Minnesota Med* 1996; 79: 29-32.
204. Pugliese MT, Blumberg DL, Hludzinski J, Kay S. Nutritional rickets in suburbia. *J Am Coll Nutr* 1998; 17: 637-641.
205. Sills IN, Skuza KA, Horlick MNB, Schwartz MS, Rapaport R. Vitamin D deficiency rickets. Reports of its demise are exaggerated. *Clin Pediatr* 1994; 33: 491-493.
206. Binet A, Kooh SW. Persistence of vitamin D- deficiency rickets in Toronto in the 1990s. *Can J Public Health* 1996; 87: 227-230.
207. Ryan AS. The resurgence of breast-feeding in the United States. *Pediatrics* 1997; 99: e12.
208. Rosenberg KD, McMurry C, Kerker BS, Na Y, Graham EH. Breast-feeding initiation in New York City, 1979 to 1996. *Am J Public Health* 1988; 88: 1850-1852.

209. Kreiter SR, Schwartz RP, Kirkman HN Jr., Charlton PA, Calikoglu AS, Davenport ML. Nutritional rickets in African American breast-feed infants. *Journal Pediatrics* 2000;137: 153-157.
210. Hartman JJ. Vitamin D deficiency rickets in children: prevalence and need for community education. *Orthop Nurs* 2000; 19: 63-68.
211. Blok BH, Grant CC, McNeil AR et al. Characteristics of children with florid vitamin D deficiency rickets in the Auckland region in 1988. *NZ Med J* 2000; 113: 374-376.
212. Biser-Rohrbaugh A, Haddley-Miller N. Vitamin D deficiency in breast-fed toddlers. *J Pediatr Orthop* 2001; 21: 508-511.
213. Bishop N. Rickets today-children still need milk and sunshine. *N Engl Med* 1999; 341: 602-604.
214. Holick MF. Vitamin D requirements for humans of all ages: new increased requirements for women and men 50 years and older. *Osteoporos* 1998; 8: S25-S29.
215. Bell NH, Greene A, Epstein S et al. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks *J Pediatr* 1985; 76: 470-473.
216. Krall E, Sahyoun N, Tannenbaum S et al. Effect of vitamin D intake on season variations in parathyroid hormone secretion in postmenopause women. *N Engl J Med* 1989; 321: 1777-1783.
217. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for Bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2000; 22: 477-501.
218. Kauppinen Makeline R, Tahtela R, Loytyniemi EA et al. High prevalence of hypovitaminosis D in Finnish medical in-and outpatients. *J Intern Med* 2001; 249: 559-563.
219. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998; 351: 805-806.
220. Harris SS, Soteriades E, Stina Coolidge JA et al. Vitamin D insufficiency and Hyperparathyroidism in a low Income, Multiracial, Elderly Population. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 85: 125-130.
221. Thomas KK, Lloyd Jones DH, Thadhani RI et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338: 777-783.
222. Dawson-Hughes B, Harris S, Krall EA et al. Rates of bone loss in postmenopausal women randomly assigned to one of two dosages of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 1140-1145.
223. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and the cutaneous synthesis of vitamin D₃. Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 373-376.
224. Webb AR, DeCosta BR, Holick MF. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 882-887.
225. Chen TC. Photobiology of vitamin D. In *Vitamin D-Physiology Molecular Biology and Clinical Applications*. Edited by Holick MF, Totowa NJ. Humana Press 1999; 17-37.
226. Holick MF. Evolution biologic functions and recommended dietary allowances for vitamin D. In *Vitamin D-Physiology Molecular Biology and Clinical applications*. Edited by Holick MF, Totowa NJ. Humana Press 1998; 1-16.
227. Holick MF. Biologic effects of light: historical and new perspectives. In: *Biologic Effects of Light*. Edited by Holick MF and Jung EG. Boston Kluwer Academic Publisher 1999; 11-32.
228. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994. Vitamin D: new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 619-630.
229. Holick MF. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical applications. In *primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 3rd ed. Edited by MJ Favus. Philadelphia: Lippincott Raven, 1999; 92-98.
230. Lund B, Sorensen OH. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in serum and its relation to sunshine age and vitamin D intake in the Danish population. *Scand J Clin Lab Invest* 1979; 39: 23-30.
231. Reid IR, Gallagher DJA, Bosworth J. Prophylaxis against vitamin D deficiency in the elderly by regular sunlight exposure. *Age Ageing* 1985; 15: 35-40.
232. Holick MF. Vitamin D: underappreciated D-light hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 2002; 9: 87-98.
233. Chuck A, Todd J, Diffey B. Subliminal ultraviolet B irradiation for the prevention of vitamin D deficiency in the elderly: a feasibility study. *Photoderm Photoimmun Photomed* 2001; 17: 4, 168-171.
234. Koutkia P, Chen TC, Lu Z et al. Treatment of vitamin D deficiency due to Crohn's disease with tanning bed ultraviolet B irradiation. *Gastroenterology* 2001; 121: 1485-1488.
235. Huldshinsky K. Die Behandlung der Rachitis durch Ultraviolet-bestrahlung. *Z. Orthop Chir* 1920; 39: 426-451.
236. Holick MF, Shao Q, Liu WW, Chen TC. The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *N Engl J Med* 1992; 327: 1637-1642.
237. Norman AW. On becoming a molecular endocrinologist. *Steroids* 2001; 66: 129-136.
238. Norman AW, DeLuca HF. The preparation of H³-vitamins D₂ and D₃ and their localization in the rat. *Biochemistry* 1963; 2: 1163-1168.
239. Norman AW, DeLuca HF. Chromatographic separation of mixtures of vitamin D₂, ergosterol, and tachysterol₂. *Anal Chem* 1963; 35: 1247-1250.
240. Lindberg O, Duffy JJ, Norman AW, Boyer PD. Characteristics of bound phosphohistidine labeling in mitochondria. *J Biol Chem* 1965; 240: 2850-2854.
241. Norman AW, Bieber LL, Linderberg O, Boyer PD. Relationship of Ca²⁺ to "protein-bound" phosphate fractions of mitochondria. *J Biol Chem* 1965; 240: 2855-2862.
242. Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 1962;18: 387-414.
243. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 55: 2574-2581.
244. Edelman IS, Borgoroch R, Porter GA. On the mechanism of action of adosterone on sodium transport: The role of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 50: 1169-1180.
245. Norman AW. The mode of action of vitamin D. *Biol Rev* 1968; 43: 97-137.
246. Haussler MR, Myrtle JF, Norman AW. The association of a metabolite of vitamin D₃ with intestinal mucosa chromatin, in vivo. *J Biol Chem* 1968; 243: 4055-4064.
247. Myrtle JF, Haussler MR, Norman AW. Evidence for the biologically active form of cholecalciferol in the intestine. *J Biol Chem* 1970;145: 1190-1196.
248. Myrtle JF, Haussler MR, Norman AW. Evidence of biologically active form of cholecalciferol in the intestine; a nutrition classic. *Nutr Rev* 1991; 49: 302-305.

249. Myrtle JF, Norman AW. Vitamin D: cholecalciferol metabolite highly active in promoting intestinal calcium transport. *Science* 1971; 171: 78-82.
250. Norman AW, Myrtle JF, Midgett RJ, Nowicki HG, Williams V, Popjak G. $1\alpha, 25$ -Dihydroxycholecalciferol: identification of the proposed active form of vitamin D_3 in the intestine: *Science* 1971; 173: 51-54.
251. Lawson DEM, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH. Identification of $1,25$ -dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature* 1971; 230: 228-230.
252. Holick MF, Schonoes HK, DeLuca HF. Identification of $1,25$ -dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D_3 metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 803-804.
253. Haussler MR, Norman AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci* 1969; 62: 155-162.
254. Haussler MR, Norman AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite: A nutrition classic. *Nutr Rev* 1985; 43: 181-183.
255. Brickman AS, Coburn JW, Norman AW. Action of $1,25$ -dihydroxycholecalciferol, a potent, kidney-produced metabolite of vitamin D_3 , in uremic man. *New Engl J Med* 1972; 287: 891-895.
256. Brickman AS, Coburn JW, Massry SG, Norman AW. $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in normal man and patients with renal failure. *Ann Inter Med* 1974; 80: 161-168.
257. Narwid TA, Blount JF, Iacobelli JA, Uskokovic MR. Vitamin D_3 metabolites III. Synthesis and X-ray analysis of $1\alpha, 25$ -dihydroxycholesterol. *Helv Chim Acta* 1974; 57: 780-789.
258. O'Malley BW, Schrader WT. The receptors of steroid hormones. *Sci Am* 1976; 234: 3243.
259. Walters MR, Hunziker W, Norman AW. Unoccupied $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 receptors: nuclear/cytosol ratio depends on ionic strength. *J Biol Chem* 1980; 255: 6799-6805.
260. Hunziker W, Walters MR, Bishop JE, Norman AW. Studies on the mode of action of calciferol (XLVI) unoccupied and in vitro and in vivo occupied $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 intestinal receptors. *J Biol Chem* 1983; 258: 8642-8648.
261. Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 1984; 307: 747-749.
262. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-747.
263. Putkey JA, Spielvogel AM, Sauerheber RD, Dunlap CS, Norman AW. Studies on the mode of action of calciferol. XXXIX. Vitamin D-mediated intestinal calcium transport: effect of essential fatty acid deficiency and spin label studies of enterocyte membrane lipid fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1982; 688: 177-190.
264. Putkey JA, Norman AW. Studies on the mode of action of calciferol (XLV) vitamin D: its effect on the protein composition and core material structure of the chick intestinal brush border membrane. *J Biol Chem* 1983; 258: 8971-8978.
265. Hunziker W, Siebert PD, King MW, Strucki P, Dugaiczky A, Norman AW. Molecular cloning of a vitamin D-dependent calcium-binding protein mRNA sequence from chick intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4228-4232.
266. Nemere I, Leathers VL, Thompson BS, Luben RA, Norman AW. Redistribution of calbindin-D28k in chick intestine response to calcium transport. *Endocrinology* 1991; 129: 2972-2984.
267. Christakos S, Norman AE. Studies on the mode of action calciferol XXIX-Biochemical characterization of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 receptors in chick pancreas and kidney cytosol. *Endocrinology* 1981; 108: 140-149.
268. Norman AW, Frankel BJ, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980; 209: 823-825.
269. Kadowaki S, Norman AW. Studies on the mode of action calciferol (XLIX) dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 1984; 73: 759-766.
270. Cade C, Norman AW. Vitamin D_3 improves impaired glucose-tolerance and insulin-secretion in the vitamin D-deficiency rat in vivo. *Endocrinology* 1986; 119: 84-90.
271. Kadowaki S, Norman AW. Studies on the mode of action of calciferol (LIX) time-course study of the insulin secretion after $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 administration. *Endocrinology* 1985; 117: 1765-1771.
272. Cade C, Norman AW. Rapid normalization/stimulation by $1,25(OH)_2$ -vitamin D_3 of insulin and glucose tolerance in the vitamin D-deficient rat. *Endocrinology* 1987; 120: 1490-1499.
273. Wing RM, Okamura WH, Pirio MR, Sine SM, Norman AW. Vitamin D_3 ; Conformations of vitamin D_3 , $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 , and dihydrotachysterol3. *Science* 1971; 186: 939-941.
274. Okamura WH, Norman AW, Wing RM. Vitamin D: concerning the relationship between molecular topology and biologic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4194-4197.
275. Norman AW, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone $1\alpha, 25(OH)_2$ -vitamin D_3 act as agonist for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids* 2001; 66: 147-158.
276. Norman AW, Adams D, Collins ED, Okamura WH, Fletterick RJ. Three-dimensional model of the ligand binding domain of the nuclear receptor for $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D_3 . *J Cell Biochem* 1999; 74: 323-333.
277. Henry HL, Midgett RJ, Norman WA. Studies on calciferol metabolism X: Regulation of 25 -hydroxyvitamin D_3 -1-hydroxylase, in vivo. *J Biol Chem* 1974; 249: 7584-7592.
278. Henry HL, Norman WA. Studies on calciferol metabolism IX. Renal 25 -hydroxyvitamin D_3 -1-hydroxylase. Involvement of cytochrome p-450 and other properties. *J Biol Chem* 1974; 249: 7529-7535.
279. Henry HL, Norman WA. Presence of renal 25 -hydroxyvitamin-D-1-hydroxylase in species of all vertebrate classes. *Com Biochem Physiol* 1975; 50: 431-434.
280. Malluche HH, Henry HL, Meyer-Sabellek W, Sherman D, Massry SG, Norman AW. Effects and interactions of $24R, 25(OH)_2D_3$ and $1,25(OH)_2D_3$ on bone. *Am J Physiol* 1980; 238: 494-498.
281. Norman AW, Henry HL, Malluche HH. $24R, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 and $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 are both indispensable for calcium and phosphorus homeostasis. *Life Sci* 1980; 27: 229-237.
282. Henry HL, Norman AW. Vitamin D: Two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability. *Science* 1978; 201: 835-837.
283. Seo EG, Einhorn TA, Norman AW. $24R, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 : An essential vitamin D_3 metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology* 1997; 138: 3864-3872.

284. Kato A, Seo EG, Einhorn TA, Bishop JE, Norman AW. Studies on 24R, 25-dihydroxyvitamin D₃: Evidence for a non-nuclear membrane receptor in the chick tibial fracture-healing callus. *Bone* 1998; 23: 141-146.
285. Nemre I, Yoshimoto Y, Norman AW. Studies on the mode of action of calciferol. LIV. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement with 14 min of exposure to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1984; 115: 1476-1483.
286. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW. Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, in basal-lateral membranes of chicks intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 1994; 269: 23750-23756.
287. Norman AW, Okamura WH, Farach-Carson MC, Allewaert K, Branisteanu D, Nemere I, Muralidharan KR, Bouillon R. Structure-Function studies of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the vitamin D endocrine system. 1,25-Dihydroxy-penta-deuterio-previtamin D₂ (as a 6-s-ces analog) simulates nongenomic but not genomic biologic responses. *J Biol Chem* 1993; 268: 13811-13819.
288. Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, Norman AW, Horst RL. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *New Engl J Med* 1981; 305: 440-443.
289. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Synthesis in vitro of 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and 24, 25-dihydroxyvitamin D₃ by interferon- γ -stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1987; 262: 10931-10937.
290. Munker R, Norman AW, Koeffler HP. Vitamin D compounds: Effect on clonal proliferation and differentiation of human myeloid cells. *Clin Invest* 1986; 78: 424-430.
291. Norman AW, Zhou JY, Henry HL, Uskokovic MR, Koeffler HP. Structure-function studies on analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: differential affects on leukemic cell growth, differentiation, and intestinal calcium absorption. *Cancer Res* 1990; 50: 6857-6864.
292. Zhou JY, Norman AW, Chen D, Sun G, Uskokovic MR, Koeffler HP. 1 α ,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃ prolongs survival time of leukemic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3929-3932.
293. Norman AW, Litwack GL. *Hormones*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press 1997; 1-558.
294. Kodicek E. Metabolic studies on vitamin D. In: *Ciba Found. Symp. Bone Structure and Metabolism*, edited by G.W.E. Wolsteholme and C.M. O'Connor. Boston: Little, Brown, 1956; 161-174.
295. Kodicek E. The metabolism of vitamin D In: *Fourth Intern. Cong. Biochem. Vitamin Metabolism*. London: Pergamon 1960; Vol. XI, 198-208.
296. Norman AW, Lund J, DeLuca HF. Biologically active forms of vitamin D₃ in kidney and intestine. *Arch Biochem Biophys* 1964; 108: 12-21.
297. Neville PF, DeLuca HF. The synthesis of (1,2-³H)-vitamin D₃ and the tissue localization of a 0.25 μ x (10 IU) dose per rat. *Biochemistry* 1996; 5: 2201-2207.
298. Lund J, DeLuca HF. Biologically active metabolite of vitamin D₃ form bone, liver, and blood serum. *J Lipid Res* 1966; 7: 739-744.
299. Lund J, De Luca HF, Horsting M. Formation of vitamin D esters in vivo. *Arch Biochem Biophys* 1967; 120: 513-517.
300. Imrie MH, Neville AW, Snellgrove W, DeLuca HF. Metabolism of vitamin D₂ and vitamin D₃ in the rachitic chick. *Arch Biochem Biophys* 1967; 20: 525-532.
301. DeLuca HF, Weller M, Blunt WJ, Neville PF. Synthesis, biological activity, and metabolism of 22, 23-3H-vitamin D₄. *Arch Biochem Biophys* 1968; 124: 122-128.
302. Fraser DR, Kodicek E. Vitamin D esters: Their isolation and identification in rat tissues. *Biochem J* 1965; 96: 59P-60P.
303. Fraser DR, Kodicek E. The synthesis of vitamin D esters in the rat. *Biochem J* 1996; 100: 67P.
304. Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. *Nature* 1970; 228: 764-766.
305. Mor II H, Lund J, Neville PF, DeLuca HF. Biological activity of vitamin D metabolite. *Arch Biochem Biophys* 1967; 120: 508-512.
306. Blunt J, DeLuca F, Schnoes HK. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry* 1968; 7: 3317-3322.
307. Blunt J, Tanaka Y, DeLuca F. The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci US* 1968; 61: 1503-1506.
308. Blunt J, DeLuca F. The synthesis of 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry* 1969; 8: 671-675.
309. Ponchon G, Kennan AL, DeLuca HF. "Activation" of vitamin D by the liver. *J Clin Invest* 1969; 48: 2023-2037.
310. Ponchon G, DeLuca HF. Metabolites of vitamin D₃ and their biologic activity. *J Nutr* 1969; 99: 157-167.
311. Ponchon G, DeLuca HF. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. *J Clin Invest* 1969; 246: 7748-7754.
312. Horsting M, DeLuca F. In vitro production of 25-hydroxycholesterol. *Biochem. Biophys Res Commun* 1969; 36: 251-256.
313. Haussler MR, Myrtle F, Norman W. The association of metabolite of vitamin D₃ with intestinal chromatin in vivo. *J Biol Chem* 1968; 243: 4055-4064.
314. Kodicek E. Turnover and distribution of vitamin D and its mode of action. In: *The transfer of calcium and strontium across biological membranes*, edited by R.H. Wasserman. New York: Academic 1963; 185-196.
315. Holick MF, DeLuca F. A new chromatographic system for vitamin D₃ and its metabolites: resolution of a new vitamin D₃ metabolite. *J Lipid Res* 1971; 12: 460-465.
316. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca F, Suda T, Cousins J. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry* 1971; 10: 2799-2804.
317. Holick MF, Garabedian M, DeLuca F. 1,25-dihydroxycholecalciferol: metabolite of vitamin D₃ active on bone in anephric rats. *Science* 1972; 176: 1146-1147.
318. Holick MF, Garabedian M, DeLuca F. The 5,6-trans isomers of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol: substitutes for 1,25-dihydroxycholecalciferol in anephric animals. *Biochemistry* 1972; 11: 2715-2719.
319. Semmler EJ, Holick F, Schnoes HK, DeLuca HF. The synthesis 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol a metabolically active form of vitamin D₃. *Tetrahedron letters* 1972; 40: 4147-4150.
320. Haussler MR, Boyce W, Littledike W, Rasmussen H. A rapidly acting metabolite of vitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 1971; 68: 177-181.

321. Omdahl JL, Holick M, Suda T, Tanaka Y, DeLuca HF. Biological activity of 1,25-hydroxycholecalciferol. *Biochemistry* 1971; 10: 2935-2940.
322. Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF. Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nature (New Biol)* 1972; 237: 63-64.
323. Tanaka Y, DeLuca HF. Bone mineral mobilization active of 1,25-dihydroxycholecalciferol; a metabolite of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 1971; 146: 574-578.
324. Tanaka Y, DeLuca HF, Omdahl J, Holick MF. Mechanism of action of 1,25-dihydroxycholecalciferol on intestinal calcium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 1971; 68: 1286-1288.
325. Boyle I, Gray W, DeLuca F. Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalciferol. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 1971; 68: 2131-2134.
326. Boyle I, Miravet R, Gray W, Holick F, DeLuca F. The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in nephrectomized rats. *Endocrinology* 1972; 90: 605-608.
327. Suda T, DeLuca HF, Schnoes HK, Ponchon G, Tanaka Y, Holick MF. 21,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D₃ preferentially active on bone. *Biochemistry* 1970; 9: 2917-2922.
328. Suda T, DeLuca HF, Schnoes HK, Tanaka Y, Holick MF. 21,25-dihydroxycholecalciferol; a metabolite of vitamin D₃ with intestinal calcium transport activity. *Biochemistry* 1970; 9: 4776-4780.
329. Suda T, Hallick RB, DeLuca HF, Schnoes HK. 21,25-dihydroxycholecalciferol. Synthesis and biological activity. *Biochemistry* 1970; 9: 1651-1657.
330. Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, Segart S, Verstuyf A. Vitamin D metabolism and action. *Osteoporosis Int* 1998 (suppl); 8: S13-19.
331. Kato A, Seo EG, Einhorn TA, Norman AW. 24R,25-hydroxyvitamin D₃, essential for the fracture healing process and has a receptor in the fracture healing callus. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, editors. *Vitamin D: chemistry, biology and clinical applications of the steroid hormone*. University of California-Riverside 1997; 645-646.
332. Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, Segart S, Verstuyf A. Vitamin D Metabolism and action. *Osteoporosis Int* 1998; suppl 8: S13-S19.
333. Morris JG. Ineffective synthesis of vitamin D in Kittens exposed to sun or UV light in reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, editors. *Vitamin D, Chemistry, biology and clinical applications of the steroid hormone*. University of California Riverside, 1997; 721-722.
334. Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Chen TS, Zhao Z, Tint GS. Reproducing abnormal cholesterol biosynthesis as seen the Smith-Lemli-Opitz syndrome inhibiting the conversion of 7-dehydrocholesterol in rats. *J Clin Invest* 1995; 95: 76-81.
335. Cunniff C, Kratz LE, Moser A, Natowicz MR, Kelley RI. Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome abnormal cholesterol metabolism. *AM J Med Genet* 1997; 68: 263-269.
336. Okuda KI, Usui E, Ohyama Y. Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. *J Lipid Res* 1995; 36: 1641-1652.
337. Leitersdorf E, Safadi R, Meiner V, Reshef A, Björkhem I, Friedlander Y, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis in the Israeli Druze: molecular genetics and phenotypic characteristics. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 907-915.
338. St.Arnaud R, Arabían A, Travers R, Glorieux FH. Abnormal intramembranous ossification in mice deficient for the vitamin D 24-hydroxylase gene. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, editors. *Vitamin D: chemistry biology clinical applications of the steroid hormone*. University of California-Riverside 1997; 635-641.
339. Miller WL. Genetics of vitamin D biosynthesis and its disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 15: 95-109.
340. Ohyma Y, Noshiro M, Okuda K. Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase. *FEBS Letters* 1991; 278: 195-198.
341. Ohyma Y, Noshior M, Eggertsen G et al. Structural characterization of the gene encoding rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase. *Biochemistry* 1993; 32: 76-82.
342. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 α ,25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 90: 4543-4547.
343. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 α ,25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1263: 1-9.
344. Norman AW, Putkey JA, Nemere I. Intestinal calcium transport: pleiotropic effects mediated by vitamin D. *Fed Proc* 1982; 41: 78-83.
345. Wasserman RH, Fullmer CS, Shimura F. Calcium absorption and the molecular effects of vitamin D₃. In: Kumar R (ed) *Vitamin D: Basic and Clinical Aspects*. Nijhoff, Boston, 1984; 233-257.
346. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.
347. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptors on osteoclasts of calcium-deficient chicken despite demonstrable receptors on circulating monocytes. *J Clin Invest* 1986; 77: 312-314.
348. Norman AW. Intestinal calcium absorption a vitamin D-hormone-mediated adaptative response. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 190-300.
349. Sánchez A, Puche R, Zenis, Oliver B, Galich AM, Maffei L, Plantalech L, Poudes G, Bregni C. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (parte I) *REEMO* 2002;11: 201-217.
350. Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, et al. Regulation by vitamin D metabolites of messenger RNA of parathyroid hormone in isolated parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4270-4273.
351. Norris KC. Secondary hyperparathyroidism: defining a model of optimal management. *Dial. Transplant* 1999; 28: 630-640.
352. Slatopolsky E. The role of calcium, phosphorus and vitamin D metabolism in the development of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol. Dial. Transplant* 1998; 13: 3-8.
353. Silver J. Regulation of the parathyroid hormone gene by Ca²⁺, phosphate and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Nephrol. Dial. Transplant* 1998; 13: 40-44.
354. Friedman TC, Norris KC. The role of vitamin D in mild to moderate chronic kidney disease. *The Endocrinology & Metabolism* 2002; 13: 189-194.

355. Nishii Y, Okano T. History of the new vitamin D analogs: studies on 22-oxacalcitriol (OCT) and 2 β -(3-hydroxypropoxy) calcitriol (ED-71). *Steroids* 2001; 66: 137-146.
356. Holick MF, Schonoes HK, DeLuca HF, Suda T, Cousins RJ. Isolation and identification of 1, 25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry* 1971; 10: 2799-2804.
357. Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor: Competitive binding of vitamin D analogs. *Life Sci* 1973; 13: 1737-1746.
358. Kream BE, Reynolds RD, Knutson JC, Eisman JA, DeLuca HF. Intestinal cytosol binders of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D and 25 hydroxyvitamin D. *Arch Biochem Biophys* 1976; 176: 779-787.
359. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroids. *Science* 1979; 206: 1188-1190.
360. Pike JW, Gooze LL, Hausler MR. Biochemical evidence for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D receptor macromolecules in parathyroid, pancreas, pituitary and placental tissues. *Life Sci* 1980; 26: 407-414.
361. Abe E, Miyaura C, Sakagami C, Takeda H, Konno M, Yanazaki K, Yoshiki T, Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4990-4994.
362. Wovkulich PM, Batcho AD, Baggiolini EG, Boris A, Truitt G, Uskokovic MR. Synthesis of 1 α ,25-trihydroxy- Δ ²²-cholecalciferol, a potent inducer of cell differentiation. In: Norman AW, Schaefer K, Grigoleit HG, Herrath D, editors. *Vitamin D: Chemical Biochemical and clinical update*. Walter de Gruyter. Berlin, New York. 1985; 755-757.
363. Murayama E, Miyamoto K, Kubodera M, Mori T, Matsunaga I. Synthesis studies of vitamin D₃ analogs. VIII. Synthesis of 22-oxavitamin D₃ analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1986; 34: 4410-4413.
364. Calverley MJ. Synthesis of MC903, a biologically active vitamin D metabolite. *Tetrahedron* 1987; 43: 4609-4619.
365. Perlman K, Kutner A, Prah J, Smith C, Inaba M, Schnoes HK, DeLuca HF. 24-Homologated 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ compounds: Separation of calcium and cell differentiation activities. *Biochemistry* 1990; 29: 190-196.
366. Zhou JY, Norman AW, Chen D, Sun GW, Uskokovic MR, Koeffler HP. 1,25-dihydroxyvitamin-16-ene-23-yne-vitamin D₃ prolongs survival time of leukemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3929-3932.
367. Abe J, Morikawa M, Miyamoto K, Kaiho S, Fukushima M, Miyaura C, Abe E, Suda T, Nishii Y. Synthesis analogues of vitamin D₃ with an oxygen atom in the side chain skeleton. *FEBS Lett* 1987; 226: 58-62.
368. Binderup L, Bramm E. Effects of a novel vitamin D analogue MC903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 889-895.
369. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Takita Y, Nishii Y. Regulatory activities of 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1,25-dihydroxyvitamin D₃, a novel synthetic vitamin D₃ derivative, on calcium metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1444-1449.
370. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995; 16: 200-207.
371. Nakagawa N, Sowa Y, Kurobe M, Ozono K, Siu-Caldera ML, Reddy GS, Uskokovic MR, Okano T. Differentiation activities of 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D₃ analogs and their 3-epimers on human promyelocytic leukemia (HL-60) cell differentiation and apoptosis. *Steroids* 2001; 66: 327-337.
372. Okano T, Nakagawa K, Tsugawa N, Ozono K, Kubodera N, Osawa A, Terada M, Mikami K. Singly dehydroxylated A-ring analogues of 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 22-nor-22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: Novel vitamin D₃ analogues with potent transcriptional activity but extremely low affinity for vitamin D receptor. *Biol Pharm Bull (Tokyo)* 1998; 21: 1300-1305.
373. Okano T, Nakagawa K, Kurobe M, Ozono K, Konno K, Fujishima T, Takayama H. Structure-specific control of apoptosis by novel 2-methyl-A-ring stereoisomers of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* (in press).
374. Bouillon R. Increasing evidence for cooperative effects between 1 α ,25(OH)₂ D₃ and other immunosuppressants. In: Suda T, editor. *International Bone Forum, Cancer, Inflammation and Bone*. Tokyo: Medical Culture 1998; 8-13.
375. Brown AJ, Ritter CR, Finch JL, Morrissey J, Martin KJ, Murayama E, Nishii Y, Slatopolsky E. The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalcitriol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 1989; 84: 728-732.
376. Finch JL, Brown AJ, Mori T, Nishii Y, Slatopolsky E. Suppression of PTH and decreased action on bone are partially responsible for the low calcemic activity of 22-oxacalcitriol relative to 1, 25(OH)₂ D₃. *J Bone Miner Res* 1992; 9: 835-839.
377. Dusso AS, Negrea L, Finch J, Kamimura S, Lopez-Hilker S, Mori T, Nishii Y, Brown AJ, Slatopolsky E. The effect of 22-oxacalcitriol on serum calcitriol. *Endocrinology* 1992; 130: 3129-3134.
378. Finch J, Brown AJ, Kubodera N, Nishii Y, Slatopolsky E. Differential effects of 1, 25(OH)₂ D₃ and 22-oxacalcitriol on phosphate and calcium metabolism. *Kidney Int* 1993; 43: 561-566.
379. Denda M, Finch J, Brown AJ, Nishii Y, Kubodera N, Slatopolsky E. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 22-oxacalcitriol prevent the decrease in vitamin D receptor content in the parathyroid glands of uremic rats. *Kidney Int* 1996; 50: 34-39.
380. Nishii Y, Abe J, Sato K, Kobayashi T, Okano T, Tsugawa N, Slatopolsky E, Brown AJ, Dusso A, Raisz LG. Characteristic of two novel vitamin D₃ analogs; 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃[OCT] and 2 β -(3-hydroxypropoxy) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [ED-71]. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, editors. *Vitamin D: gene regulation, structure-function analysis and clinical application*. De Gruyter: Berlin, New York 1991; 289-297.
381. Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Ohta M. Conformation function relationship of vitamin D: conformational analysis predicts potential side-chain structure. *J Med Chem* 1998; 41: 1467-1475.
382. Kobayashi T, Tsugawa N, Okano T, Masuda S, Takeuchi A, Kubodera N, Nishii Y. The binding properties, with blood proteins, and tissue distribution of 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in rats. *J Biochem (Tokyo)* 1994; 115: 373-380.
383. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Nishii Y. Protein-binding properties of 22-oxa-1 α ,25-

- dihydroxyvitamin D₃, a synthetic analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Nutr Sci Vitaminol* 1989; 35: 529-533.
384. Slatopolsky E, Finch J, Brown A. New vitamin D analogs. *Kidney International* 2003; 63: S83-S87.
 385. Bikle DD. Clinical counterpoint: vitamin D: New actions, new analogs, new therapeutic potential. *Endocrine Rev* 1992; 13: 765-784.
 386. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Selective vitamin D analogs and their. *Am J Kidney Dis* 1995; 26(5): 852-860.
 387. Slatopolsky E, Finch J, Ritter C et al. A new analog of Calcitriol, 19-nor-1,25(OH)₂D₃, suppresses parathyroid hormone secretion in uremic in the absence of hypercalcemia. *Am J Kidney Dis* 1995; 26(5): 852-860.
 388. Takahashi F, Finch JL, Denda M, et al. A new analogue of 1,25(OH)₂D₃, 19-nor-1,25(OH)₂D₂, suppresses PTH parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am J Kidney Dis* 1997; 30(1): 105-112.
 389. Martin KJ, Gonzales EA, Gellens M et al. 19-nor-1- α -25-dihydroxyvitamin D₂ (Paricalcitol) safely and effectively reduces the levels of intact parathyroid hormone in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1427-1432.
 390. Maung HM, Elangovan L, Frazao JM, et al. Efficacy and side effects of intermittent intravenous and oral doxercalciferol (1 α -hydroxyvitamin D(2) in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. A sequential comparison. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 532-543.
 391. Teng M, Wolf M, Lowrie E Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 446-456.
 392. Drücke TB. Paricalcitol as compared with calcitriol in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2003; 349: 496-499.
 393. Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 252-264.
 394. Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1998; 7: 391-395.
 395. Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, Tseng TT, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS, Holick MF. 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* 2001; 357: 1673-1674.
 396. Cross HS, Baeris P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. 25-hydroxyvitamin D₃-1 hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human mucosa in elevated during early carcinogenesis. *Steroids* 2001; 66: 287-292.
 397. James SY, Williams MA, Kelsey SM, Newland AC, Colston KW. The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 625-634.
 398. Park WH, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Binderup L, Koeffler HP, Kim BK, Lee YY. Induction of apoptosis by vitamin D₃ analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase. *Br J Haematol* 2000; 109: 576-583.
 399. Suzuki S, Takenoshita S, Furukawa H, Tsuchiya A. Antineoplastic activity of 1,25(OH)₂D₃ and its analogue 22-oxacalcitriol against human anaplastic thyroid carcinoma cell lines in vitro. *Int J Mol Med* 1999; 4: 611-614.
 400. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero Menei CN, Berger F, Wion D. New clues about vitamin D, functions in the nervous system trend in *Endocrinology & Metabolism* 2002; 13: 100-105.
 401. Balabanova S et al. 25-Hydroxyvitamin D₂₄-25 dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr* 1984; 62: 1086-1090.
 402. Partridge WM, et al. Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 1985; 44: 1138-1141.
 403. Neveu I, et al. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by rat brain macrophages in vitro. *J Neurosci Res* 1994; 38: 214-220.
 404. Naveilhan P, et al. Expression of 25(OH) vitamin D₃ 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuro Report* 1993; 5: 255-257.
 405. Nemere I, et al. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998; 248: 443-449.
 406. Rupprecht R, et al. Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 1999; 22: 410-416.
 407. Zakon HH, et al. The effect of steroid hormones on electrical activity of excitable cells. *Trends Neurosci* 1998; 21: 202-207.
 408. Lemire JM, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991; 87: 1103-1107.
 409. Matkovits T, et al. Ligand occupancy is not required for vitamin D receptor and retinoid receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 232-242.
 410. Pillai S, Bikle DD, Elias PM. 1,25-dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem* 1987; 263: 5390-5395.
 411. Smith EL, Pincus SH, Donovan L, Holick MF. A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 516-528.
 412. Kragballe K. Treatment of psoriasis by the topical application of the novel vitamin D₃ analogue MC 903. *Arch Dermatol* 1988; 125: 516-528.
 413. Provvedine DM, Tsoukaas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Sciences* 1983; 221: 118.
 414. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, et al. 1,25-dihydroxycholecalciferol and human myeloid leukemia cell line (HL-60): The presence of cytosol receptor and induction of differentiation. *Biochem J* 1982; 204: 713-719.
 415. Koeffler HP, Hirjik J, Iti L. The Southern California Leukemia Group: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃: In vivo and in vitro effects on human preleukemic and cells. *Cancer Treat Rep* 1985; 69: 1399-1406.
 416. Giuliani DL, Boland RL. Effects of vitamin D, metabolites on calcium fluxes in intact chicken skeletal muscle and myoblasts cultured in vitro. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: 200-205.
 417. De Boland AR, Boland RL. Suppression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent calcium transport by protein synthesis inhibitors and changes in phospholipids in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1985; 845: 237-241.
 418. Dritanti LN, de Boland AR, Boland RL. Changes in muscle lipid metabolism induce in vitro b 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochim Biophys Acta* 1987; 918: 83-92.
 419. Sellés J, Boland RL. In vitro calcium transport properties of skeletal muscle mitochondria from vitamin D-deficient and 1,25-dihydroxyvitamin D₃-treated chicks. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 46-50.
 420. Boland RL. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 1986; 7(4): 434-446.

421. Boland RL, de Boland AR, Ritz E, Hasselbach W. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on sarcoplasmic reticulum calcium transport in strotiumf ed chicks. *Calci Tissue Int* 1938;35:190-194
422. Boland AR, Alborno L, Boland RL. The effects of cholecalciferol in vivo protein and lipids of skeletal muscle from rachitic chicks. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 795-803.
423. De Boland AR, Gallego S, Boland RL. Effects of vitamin D₃ on phosphate and calcium transport across and composition skeletal muscle plasma cell membranes. *Biochim Acta* 1983; 733: 264-273.
424. Boland R, Norman AW, Ritz E, Hasselbach W. Presence of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in chick skeletal muscle myoblasts. *Biophys Res Commun* 1985; 128: 305-309.
425. Zanello SB, Boland RL. Detection of calbindin D-0K and vitamin D receptor expression in chick muscle. *An Asoq Quim Argent* 1993; 81(2-3): 189-195.
426. Drittanti LN, de Boland AR, Boland RL. Stimulation of calmodulin synthesis proliferating myoblasts by 1,25-dihydroxy-vitamin D₃. *Mol Cel Endocr* 1990; 74: 143-153.
427. Boland RL, Zanello SB, Marinissen MJ. Acción de la vitamina D en el músculo. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 1995; 4: 31-33.
428. Hughes DB: Vitamin D calcium: Recommenden intake for bone health. *Osteoporosis Int* 1998; 8: S30-S34.
429. Standing Committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes, Institute of Medicine. Dietary reference intakes: calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washintong, DC. National academy Press, 1997.
430. Spender H, Kramer L, Lesniak M, DeBartolo M, Norris C, Osis D. Calcium requirements in humans: report of original data and a review. *Clin Orthop* 1984; 184: 270-280.
431. Malm OJ. Calcium requirement and adoption in adult men. *Scand J Clin Lab Invest* 1958; 10(36): 1-280.
432. National Institute of health. Consensus development panel on optimal calcium intake. *JAMA* 1994; 272: 1942-1948.
433. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Calcium balance and calcium metabolism, bone metabolism and calcium balance. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 254-263.
434. Sánchez A, Puche R, Zenis, Oliver B, Galich AM, Maffei L, Plantalech L, Poudes G, Bregni C. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (parte II) REEMO 2003; 12: 14-29.
435. Kovacs C. Calcium and bone metabolism in pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2344-2348.
436. Prentice A, Yan L Jarjou L, Diva B, Laskey MA, Stirling DM, et al. Vitamin D status does not influence the breast-milk calcium concentration of lactating mothers accustomed to a low calcium intake. *Acta Pediatr* 1997; 86: 1006-1008.
437. Kovacs C, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium and lactation. *Endocrine Rev* 1997; 18: 832-872.
438. Zeni S, Portela ML. Estado nutricional con respecto al calcio en la Argentina. *Arch Latinoam Nutr* 1988; 38: 209-218.
439. García M, Langni S, Leal G, et al. Perfil bioquímico nutricional con respecto al calcio y vitamina A en un grupo de gestantes del gran Buenos Aires (resumen). *Arch Latinoam Nutr* 1994; 44: 20.
440. Lee WTK, Leung SSF, Ng MY, et al. Bone mineral content of two populations of Chinese children with different calcium intakes. *Bone Miner* 1993; 23: 195-206.
441. Pettifor JM. Dietary calcium deficiency. En: Rickets Glorieux F, editor. *Nestlé Nutrition Workshop Series* (21). New York: Raven Press 1991; 123-143.
442. Oliveri M, Mautalen C, Alonso A, Velásquez H, Troughot HA, Porto R, et al. Estado nutricional de vitamina D en madres y neonatos de Ushuaia y Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53: 3125-320.
443. Oliveri MB, Ladizesky M, Mautalen CA. Seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone in Ushuaia (Argentina), the southernmost city the world. *Bone Miner* 1993; 20: 88-108.
444. Olliveri MB, Cassinelli H, Ayala M, Mautalen CA. Vitamin D prophylaxis in children with a single dose of 150,000 UI of vitamin D. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 807-810.
445. Oliveri MB, Wittich A, Mautalen C, et al. Peripheral bone mass is not affected by winter vitamin D deficiency in children and young adults from Ushuaia. *Calcif Tissue Int* 2000; 67: 220-224.
446. Lloyd T, Martel JK, Rollings N, et al. The effect of calcium supplementation and increase in bone mineral desity in children. *N Engl J Med* 1992; 327: 82-87.
447. Bonjour JP, Carrie AL, Ferrari S, et al. Calcium enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double blind, placebo controlled trial. *J Clin Invest* 1997; 99: 1287-1294.
448. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, et al. Critical years and stanges of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol* 1993; 73: 555-563.
449. Lee WTK, Leung SSF, Leung DMY, Cheng JCY. A follow-up study on the effects of calcium supplements withdrawal and puberty on bone acquisition of children. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 71-77.
450. Gigimoto T, Kanatani M, Kano H, et al. OGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. *Am J Physiol* 1994; 266: E709-E716.
451. Peacock NH, Eximan JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimate. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 561-567.
452. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, et al. Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteoporosis Int* 2001; 12: 1026-1030.
453. Zitterman A, Scheld K, Sthele P. Seasonal variations in vitamin D status and calcium absorption do not influence bone turnover in young women. *Eur J Clin Nutrition* 1998; 52: 501-506.
454. Wishart JM, Horowitz M, Need AG, et al. Relations between calcium intake, calcitriol, polymorphisms of the vitamin D receptor gene, and calcium absorption in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 798-802.
455. Kinyamu HK, Gallagher JC, Prah J, et al. Association between intestinal vitamin D receptor, calcium absorption, and serum, 1,25-dihydroxyvitamin D in normal young and elderly women. *J Bone Miner Res* 1997;12: 922-928.
456. Bolscher MT, Netelenbos JC, Barto R, van Burner LM, Van der Vijgh WJF. Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J Bone Miner Res* 1999; 141: 1197-1202.
457. Thomas LM, Xu X, Norfleet AM; Watson CS. The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelium cells. *Endocrinology* 1993; 132: 426-430.