

Revisiones

OSTEOPOROSIS AND POLYMORPHISMS OF THE VITAMIN D RECEPTOR GENE

Association studies of bone mineral density and polymorphisms of the vitamin D receptor gene have reported contradictory results. Meta-analyses of these studies indicate that certain Bsm I genotypes have a small effect on bone mineral density. Other polymorphisms of the vitamin D receptor gene, such as the restriction site Fok I and the binding site for Cdx2, have functional effects, either on vitamin D receptor mRNA synthesis or its stability, with final consequences on the quantity and/or function of vitamin D receptor protein. Studies of the interactions among these polymorphisms and others from different candidate genes, as well as of the interactions among gene/environmental factors, may lead to greater insight into this issue. Advances in the knowledge of the genetic basis of osteoporosis could be useful not only to identify individuals prone to developing osteoporosis, but also to design new drugs for the prevention and treatment of bone disease.

Key words: Osteoporosis. Vitamin D receptor. Bone mineral density. Bone mass. Genotypes.

Osteoporosis y polimorfismos del gen del receptor de vitamina D

NORI TOLOSA DE TALAMONI

CONICET. Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico Dr. F. Cañas. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.

Estudios de asociación entre la densidad mineral ósea y los polimorfismos del gen del receptor de vitamina D arrojaron resultados muy contradictorios. Metaanálisis de dichos estudios indican que existe efecto de poca magnitud de los genotipos Bsm I sobre la densidad mineral ósea. Otros polimorfismos del gen del receptor de vitamina D, tales como el del sitio de restricción Fok I y el del sitio de unión de Cdx 2, tendrían efectos funcionales en la síntesis o la estabilidad de su ARNm, con consecuencias en la cantidad y/o la función del receptor de vitamina D. Es posible que los estudios de estos polimorfismos con los de otros genes candidatos y la interacción gen/medio ambiente arrojen más claridad. Los avances de la genética de la osteoporosis serían de utilidad no sólo para la identificación de individuos propensos a la enfermedad, sino también para el desarrollo de nuevos fármacos para la prevención y el tratamiento.

Palabras clave: Osteoporosis. Receptor de vitamina D. Densidad mineral ósea. Masa ósea. Genotipos.

INTRODUCCIÓN

Existen varias definiciones acerca del vocablo “osteoporosis”. Durante mucho tiempo se la definió como un trastorno metabólico óseo, caracterizado por baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso, que lleva a una mayor fragilidad ósea y al consiguiente incremento del riesgo de fracturas no traumáticas. Años atrás se prefirió definirla como un trastorno esquelético, caracterizado por menor resistencia ósea, y que predispone a una persona a mayor riesgo de fractura¹. En realidad, la fractura es el aspecto clínico más relevante de la enfermedad, ya que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, especialmente en los individuos de la tercera edad. Si bien la osteoporosis se puede presentar en niños y jóvenes (osteoporosis juvenil), lo habitual es que se presente en mujeres posmenopáusicas (osteoporosis posmenopáusica) o en varones y mujeres ancianos (osteoporosis senil).

Las fracturas osteoporóticas ocurren generalmente en el antebrazo distal, en las vértebras lumbares y torácicas y en el fémur proximal. La incidencia se incrementa con la edad y es más alta en blancos que en negros. La calidad de vida se deteriora progresiva-

Correspondencia: Dra. N. Tolosa de Talamoni.
Pabellón Argentina, 2.º piso. Ciudad Universitaria. Córdoba. Argentina.
Correo electrónico: ntolosa@biomed.uncor.edu

Manuscrito recibido el 6-1-2006 y aceptado para su publicación el 8-5-2006.

mente a medida que el número y la severidad de las fracturas se incrementan. Además, el riesgo de futuras fracturas osteoporóticas aumenta notoriamente después de que se han producido una o más fracturas².

El principal determinante de la masa ósea y del riesgo de fractura osteoporótica es la densidad mineral ósea (DMO), generalmente medida por absorciometría fotónica dual o absorciometría de rayos X de energía dual. Existen, además, otros factores de riesgo independientes de la DMO, tales como la edad y los antecedentes familiares y personales de fracturas³. En las mujeres posmenopáusicas, los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen la osteoporosis cuando los valores de DMO caen más de 2,5 desviaciones estándar por debajo del promedio de referencia de adultos jóvenes. La DMO no es el único factor determinante de la fuerza ósea; el tamaño y la calidad del hueso son otros componentes muy importantes. El riesgo de fractura de cadera se incrementa con el aumento de la longitud de su eje, independientemente de la DMO⁴. Otros factores, tales como la debilidad muscular y el deterioro cognitivo y de la visión, también contribuyen al riesgo de fractura osteoporótica⁵. Las caídas indudablemente constituyen también un factor importante. Cualquier hueso se fractura cuando es sometido a fuerzas excesivas, pero, a medida que la DMO es más baja, mayor es el riesgo de fractura. Se considera que un hueso tiene masa ósea baja para la edad porque no se ha acumulado mineral adecuadamente en la vida adulta joven, cuando se ha llegado al pico de masa ósea, porque se ha tenido pérdida ósea a velocidades excesivas o por ambas condiciones².

EPIDEMIOLOGÍA

La osteoporosis constituye un problema de salud pública por las complicaciones que producen las fracturas, lo cual resulta en un elevado coste económico y social y un alto grado de sufrimiento en las personas que la padecen. Se sostiene que el 50% de todas las mujeres caucásicas tendrá la enfermedad alrededor de los 80 años⁶. Datos recientes sugieren que el coste anual en Europa es de 13 billones de euros, fundamentalmente debido a los costes de hospitalización posteriores a las fracturas⁷. La distribución geográfica de esta enfermedad es bien marcada en Europa, donde la incidencia es mayor en los países del norte, quizás como consecuencia del clima, que limita la actividad física y la exposición al sol. Se espera que en las próximas dos décadas el número de fracturas de cadera se duplique en las mujeres mayores de 65 años, pese a lo cual es llamativo que muchos países europeos no hayan adoptado medidas preventivas. El riesgo de fractura osteoporótica en mujeres de Asia y África es más bajo que el de mujeres caucásicas de Estados Unidos y Europa, pero las proyecciones indican que el riesgo aumentará en el futuro. Para 2050 se espera que en el

mundo el número de fracturas de cadera aumente de 3 a 4 veces con relación al presente, y que más de la mitad ocurrirá en Asia⁸. En Latinoamérica, estudios epidemiológicos hasta 2001 revelaron que las fracturas de cadera tienen una incidencia anual de 380 mujeres y 100 varones por cada 100.000 personas mayores de 50 años⁹. Los datos de fracturas en otros sitios del esqueleto en individuos de Latinoamérica son escasos. En España, el estudio europeo EVOS puso de manifiesto una variable incidencia de fracturas vertebrales entre diferentes localizaciones españolas (Oviedo, Barcelona, Las Palmas y Madrid), entre un 7,7 y un 26,6% según el método usado para definir la fractura vertebral¹⁰.

FACTORES DE RIESGO

Es importante conocer los factores de riesgo de la osteoporosis para la identificación temprana de los individuos propensos. La osteoporosis es silenciosa y se evidencia imprevistamente con fractura ósea, de manera similar a lo que ocurre con la hipertensión arterial, que suele presentarse con un accidente cerebrovascular o cardiovascular. En ambos casos, la identificación de la población de alto riesgo es muy importante. En la osteoporosis, la identificación se centra en la búsqueda de los factores predisponentes y en la estimación del estado del hueso. Los dos factores predisponentes son la baja masa ósea, alcanzada cuando se llega al pico de masa ósea, y el grado de pérdida ósea posterior. Ambos están determinados, en gran medida, por factores genéticos, aunque también son muy importantes los factores ambientales. Entre éstos destacan como factores de riesgo las dietas pobres en calcio y hábitos de vida tales como sedentarismo, tabaquismo e ingesta excesiva de alcohol y café¹¹.

ROL DE LOS FACTORES GENÉTICOS EN LA PATOGENIA DE LA OSTEOPOROSIS

Estudios realizados en familias con o sin osteoporosis han mostrado que la adquisición de la masa ósea pico y/o la pérdida ósea son dependientes de factores familiares. Hijas de mujeres con historia de fractura de fémur tienen menor DMO femoral que las controles de iguales edad, estatura y peso. La heredabilidad de la DMO (proporción de la variación de DMO atribuible a factores genéticos) para la columna y el cuello de fémur puede oscilar entre el 40 y el 90% en diferentes sitios del esqueleto y para diversas poblaciones. En cuanto a la heredabilidad de la pérdida de hueso, se ha estimado que es de alrededor del 30% para columna y cuello de fémur en mujeres posmenopáusicas y del 60% en mujeres premenopáusicas³.

Se han realizado diferentes abordajes para identificar los genes involucrados en el desarrollo de la osteoporosis. Ellos comprenden: *a)* estudios de ligamiento en humanos, los cuales identifican regiones cromosó-

micas con genes que regulan rasgos cuantitativos tales como masa ósea y geometría esquelética; b) estudios de ligamiento en animales, que tienen como desventaja que los genes que influyen en la DMO no son necesariamente los mismos que en humanos, y c) estudios de genes candidatos, los cuales identifican polimorfismos de un gen particular y relacionan las variantes alélicas a la DMO o a las fracturas osteoporóticas en poblaciones. Estos últimos tienen la ventaja de que son más fáciles de realizar y detectan pequeños efectos, pero tienen como desventaja que pueden detectar falsos positivos o negativos y que el gen detectado no es necesariamente la causa del efecto observado, sino que está próximo a dicho gen, lo cual se llama desequilibrio de ligamiento.

En la década pasada, un número importante de genes han sido asociados a algunos rasgos de la enfermedad. Los genes candidatos están relacionados con moléculas presentes en la matriz ósea o que participan en la regulación del metabolismo óseo, tales como las hormonas calciotrópicas y sus receptores, citocinas y factores de crecimiento o sus receptores y factores de transcripción.

Las implicaciones clínicas del conocimiento de los genes asociados a la osteoporosis son muy importantes, ya que los genes que regulan la DMO y la fragilidad ósea son blancos potenciales para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad. Además, los marcadores genéticos podrían ser usados para el diagnóstico de individuos con riesgo de fracturas osteoporóticas (el *T-score* identifica sólo una pequeña proporción de individuos que sufren fracturas) y podrían ayudar a predecir fracturas independientemente de la DMO¹². También, los marcadores genéticos podrían ayudar a distinguir respondedores de no respondedores a los tratamientos e identificar a los pacientes con riesgo de desarrollar efectos secundarios no deseados.

POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D Y DENSIDAD MINERAL ÓSEA

El gen candidato que inició “la genética molecular de la osteoporosis” es el gen del receptor de vitamina D, conocido con la sigla inglesa VDR (en castellano, RVD) (fig. 1)¹³. Este gen está localizado en el cromosoma 12. En el último intrón se han localizado dos polimorfismos que son reconocidos con las restrictasas Bsm I y Apa I y en el último exón se ha hallado el sitio polimórfico Taq I. Esos polimorfismos han sido los más estudiados en asociación a la DMO en muchísimos laboratorios del mundo. Morrison et al¹⁴ fueron los primeros que observaron que los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del sitio polimórfico Bsm I del gen de RVD estaba relacionado con la osteocalcina sérica y con la DMO, en estudios llevados a cabo en mujeres australianas mellizas pos-

menopásicas. Años más tarde los mismos autores hicieron correcciones de los datos presentados anteriormente¹⁵. No obstante, a partir de entonces surgió un sinnúmero de estudios en los que se analizaba el polimorfismo Bsm I con relación a la DMO, tanto en mujeres posmenopásicas como en premenopásicas. Casi la mitad de los trabajos hallaron asociaciones entre los genotipos de RVD y la DMO en diferentes sitios del esqueleto y la otra mitad, por el contrario, obtuvo resultados negativos. En estudios de metaanálisis, Cooper y Umbrach¹⁶ concluyeron que el genotipo Bsm I de RVD influye en la DMO de sujetos ancianos, pero muy poco. En 1999, Gong et al¹⁷ analizaron 75 artículos y resúmenes sobre los genotipos del RVD y la DMO, y concluyeron que habría una asociación, especialmente en mujeres premenopásicas, pero que la heterogeneidad genética y los factores no genéticos podrían interferir en estos estudios de asociación. Hubo autores que hallaron que los genotipos de RVD influían en el pico de masa ósea en sujetos jóvenes¹⁸, mientras que otros hallaron que las interacciones entre los genotipos de RVD y la ingesta de calcio influían en la DMO¹⁹. El descubrimiento de polimorfismos de otros genes candidatos de la osteoporosis trajo como consecuencia que se analizaran también interacciones génicas y sus asociaciones con la DMO o con las fracturas osteoporóticas. Así, Uitterlinden et al²⁰ encontraron interacción entre los genotipos de RVD con los del gen de colágeno I tipo alfa y susceptibilidad a la fractura, independientemente de la DMO, y fueron los primeros que observaron una interacción *interlocus* como componente importante en el riesgo de fractura osteoporótica. Thakkinstian et al²¹ realizaron un metaanálisis de estudios de asociación entre los genotipos RVD-Bsm I y la DMO de columna y cuello de fémur (publicados entre 1994 y 2001), y llegaron a la conclusión que el alelo B está significativamente asociado a la DMO de columna lumbar y que los individuos con genotipo BB tienen DMO menor que los que portan genotipos bb o Bb, lo cual los lleva a mayor pérdida ósea con el correr del tiempo. Recientemente, ese grupo de autores ha propuesto un método para metaanálisis de estudios de asociación molecular teniendo en cuenta la necesidad de comprobar que las poblaciones sigan el equilibrio de Hardy-Weinberg y de explorar heterogeneidad procesando los datos de manera que reflejen un modelo biológico de efecto genético, evitando comparaciones múltiples²².

Un aspecto llamativo es que en los estudios que hallaron asociación entre los genotipos de RVD-Bsm I y la DMO, no siempre el mismo alelo es el alelo de riesgo que está asociado a DMO baja. Por ejemplo, el alelo B del RVD-Bsm I fue inicialmente asociado con baja DMO y muchos estudios lo confirmaron; sin embargo, otros autores hallaron que el alelo b estaba asociado a DMO baja. Algunos investigadores opinan que dado que el efecto sobre la DMO es pequeño, muy a menudo el poder estadístico es demasiado bajo y no se puede sacar conclusiones acerca de la presen-

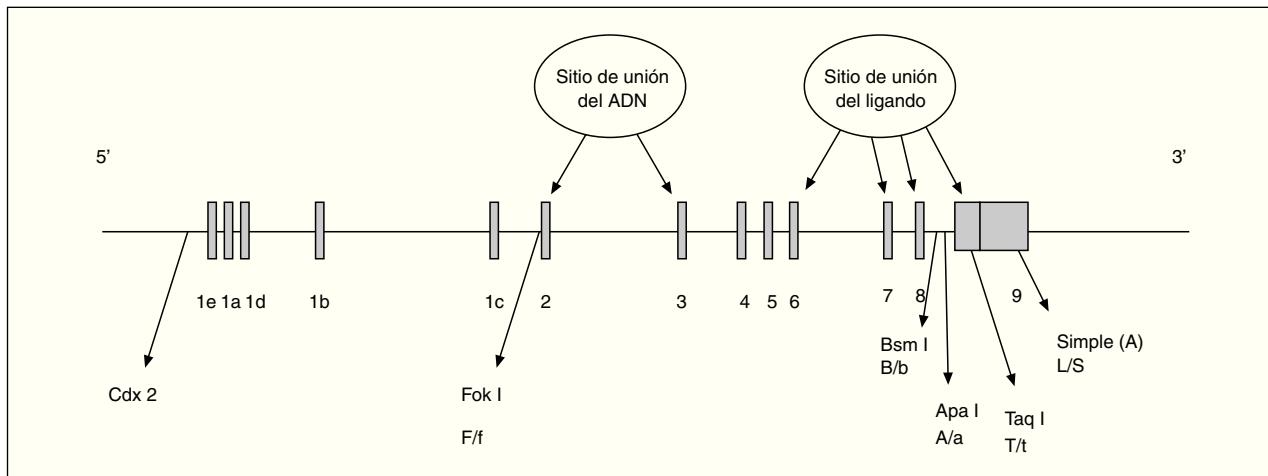


Fig. 1. Estructura y sitios polimórficos del gen del RVD humano. Los rectángulos constituyen los exones y los espacios entre ellos, los intrones. Las flechas indican la posición de los diferentes polimorfismos. Fok I, Bsm I, Apa I y Taq I representan los sitios que son cortados por dichas enzimas de restricción. Cdx 2 es un factor de transcripción que se une al ADN en un sitio que presenta polimorfismo. En la región no traducible del exón 9 existen también sitios polimórficos.

cia o ausencia de efecto. Hay otros aspectos a tener en cuenta, entre ellos que los sitios polimórficos Bsm I y Apa I no son funcionales; están ubicados en el último intrón, mientras que el sitio Taq I es un polimorfismo “sinónimo”, es decir, que genera un cambio en la secuencia de codificación, pero no produce cambio de aminoácido de la proteína codificada. Se supone que aun así los polimorfismos no funcionales podrían ser de utilidad, por su potencial uso como marcadores; si estos marcadores están asociados a un rasgo como puede ser la DMO, es probable que el alelo marcador esté ligado al alelo funcional. Ese ligamiento entre el alelo marcador y el funcional depende de la extensión del desequilibrio de ligamiento en el área del cromosoma¹¹.

Otro polimorfismo que se ha identificado en el gen de RVD y que está ubicado en el exón 2, que trae por consecuencia cambios en el sitio de comienzo de la traducción de la proteína, es el sitio Fok I. El gen de RVD tiene dos potenciales sitios de comienzo ATG y presenta polimorfismo T/C en el primer codón. Los individuos que tienen el codón ACG en lugar de ATG inician la transcripción en el segundo ATG y tienen un RVD que es 3 aminoácidos más corto²³. Aparentemente, la forma más corta del gen de RVD tiene mayor actividad transcripcional²⁴, mientras que la forma más larga ha sido asociada a DMO más baja, aunque este último hallazgo no ha sido consistente¹⁹. Jurutka et al²⁵ demostraron que la variante corta interactúa más eficientemente con el factor de transcripción TFII produciendo una proteína RVD más potente. Esto fue comprobado en más de 20 líneas celulares de fibroblastos. Mediante otra prueba de funcionalidad, que consiste en la medición de la capacidad inhibidora de crecimiento de las células mononucleares de sangre periférica por la vitamina D, se halló que las mujeres

que tenían el alelo F (correspondiente a la variante corta, de 424 aminoácidos) tenían un RVD más activo para inhibir el crecimiento celular estimulado por fitohemaglutinina²⁶. El RFLP de Fok I no está en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos observados en el extremo 3’(Taq I, Bsm I, Apa I) y, dada la distancia considerable entre el primero y estos últimos sitios (unos 40 kb) y la diferente naturaleza de los polimorfismos, el Fok I debería ser tratado como un marcador diferente¹¹. Este concepto podría aplicarse también al polimorfismo del sitio de unión del factor de transcripción Cdx 2, el cual está ubicado corriente arriba del exón 1a. Este polimorfismo consiste en un cambio de G por A y se ha demostrado que el alelo A es más activo para unirse al factor de transcripción. Se ha sugerido que dicho sitio tiene un papel importante en la transcripción específica del gen de RVD en el intestino. Dado que el intestino es el lugar de la absorción de calcio, el sitio Cdx 2 podría influir la regulación de la vitamina D sobre la absorción del catión. El alelo A aumentaría la expresión de RVD en el intestino y, por consiguiente, la transcripción de proteínas que transportan calcio, tales como calbindina 9K, 28K, TRPV5 y TRPV6. El resultado final de este mecanismo sería una mejor DMO. Efectivamente, esto fue observado en mujeres japonesas que portaban el alelo A²⁷; sin embargo, no fue comprobado en mujeres caucásicas, aunque se encontró que estaba asociado a un menor riesgo de fractura, independientemente de los valores de DMO²⁸. Tablas que contienen extensa información acerca de los efectos del polimorfismo del RVD en la DMO u otros fenotipos del hueso han sido publicadas en años recientes y su lectura es altamente recomendable^{21,29,30}.

Desde que apareció el primer estudio que demostraba asociación entre los genotipos del RVD y la

DMO, se han descrito más de 30 genes candidatos que podrían influir en la masa y la fragilidad del hueso³¹. Entre ellos, se puede citar el gen del receptor de estrógenos³², el de colágeno 1 alfa 1³³, el de la metilentetrahidrofolato reductasa³⁴, etc. Sin embargo, estos estudios han mostrado resultados conflictivos y la contribución individual de los polimorfismos a la patogenia de la osteoporosis aún permanece por dilucidarse^{2,31}.

POLIMORFISMOS DEL GEN DE RVD EN PACIENTES CON ALTERACIONES ÓSEAS PROCEDENTES DE CÓRDOBA, ARGENTINA

En un trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se estudió a alrededor de 200 mujeres posmenopáusicas sanas, osteopénicas y osteoporóticas de la ciudad de Córdoba y alrededores, clasificadas así de acuerdo con los criterios densitométricos de la OMS. En ellas se analizaron los sitios polimórficos Bsm I y Fok I del gen de RVD con relación a la DMO de cuello de fémur y de columna lumbar, y no se halló asociación de algún genotipo en particular con DMO más baja³⁵. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Garner et al³⁶, pero difieren de los hallados en mujeres mexicanas³⁷. Las razones de estas discrepancias podrían ser diferencias en la ingesta de calcio, estados menopáusicos (una rápida pérdida de calcio perimenopáusica podría enmascarar los efectos genéticos no relacionados con estrógenos), raza, edad, desequilibrio de ligamiento, heterogeneidad alélica, etc. Para disminuir el efecto que los factores ambientales pudieran tener en la DMO (dieta pobre en calcio, hábito de fumar, alcoholismo, etc.), este estudio se extendió a mujeres premenopáusicas y perimenopáusicas de la misma área geográfica, en las que tampoco se halló una asociación entre DMO y sitios polimórficos Bsm I y Fok I del gen de RVD y sitios polimórficos Xba I y Pvu II del gen del receptor de estrógenos³⁸. No se descarta que otro/s sitio/s polimórfico/s del gen de RVD o de otros genes candidatos o interacciones génicas o gen-medio ambiente pudiesen estar asociados a la DMO en esta población.

En cambio, en un estudio en pacientes con síndrome de Turner que desarrollan osteoporosis secundaria por insuficiencia estrogénica y/o propiedades intrínsecas del hueso, hemos observado que las que portan el genotipo bb (sitio polimórfico Bsm I) tienen DMO más baja, es decir, que en esta afección en particular habría asociación entre la DMO y los genotipos Bsm I de RVD, hallazgo que podría tener importantes implicaciones clínicas³⁹. La asociación entre el genotipo bb y la DMO más baja, contraria a los resultados de muchos trabajos aunque no en todos, como ya se mencionó, puede deberse a diversos factores, entre ellos heterogeneidad alélica, mezclas étnicas y diferentes interacciones gen-medio ambiente⁴⁰.

CONCLUSIONES

Desde el primer estudio que sugería asociación del genotipo Bsm I de RVD con la DMO al presente, se han detectado alrededor de 25 polimorfismos en el gen de RVD. La mayoría de ellos son polimorfismos "anónimos" (presentes en los intrones) o "sinónimos". Algunos estudios sugieren que las variaciones en la región promotora 5' pueden afectar a la expresión de la cantidad de ARNm para RVD, mientras que las variaciones en la secuencia 3' no traducible pueden afectar a la estabilidad de ARNm y/o la eficiencia de la traducción de la proteína. En conjunto, estas diferencias genotípicas podrían afectar a la cantidad de RVD y/o la función, dependiendo del tipo celular, el estado de desarrollo y el estado de activación¹¹.

Aunque varios metaanálisis indican que los polimorfismos del gen de RVD influyen en la DMO, el efecto es de poca magnitud y no se ha observado en todas las poblaciones analizadas. Más aún, entre las poblaciones es probable que sea diferente el desequilibrio de ligamiento entre alelos marcadores anónimos y los alelos causales del gen de RVD. Quizá en los años venideros se descubran nuevos polimorfismos, especialmente funcionales, que arrojen más información acerca de la influencia de los genotipos del RVD en la DMO. Por otro lado, polimorfismos de otros genes candidatos, sus interacciones con los del gen de RVD y con los factores ambientales podrían ser la clave para diagnosticar y prevenir esta enfermedad cuyo origen multifactorial y multigénico ya está ampliamente aceptado.

BIBLIOGRAFÍA

- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-95.
- Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005;161:307-20.
- Roux S. The genetics of osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 2001; 68:482-6.
- Faulkner KG, Cummings SR, Black D, Palermo L, Gluer CC, Genant HK. Simple measurement of femoral geometry predicts hip fracture: The Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res*. 1993;8:1211-7.
- Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med*. 1995;332:767-73.
- Ralston S. Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:286-90.
- Dennison E, Cole Z, Cooper C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:456-61.
- Fujiwara S. Epidemiology of osteoporosis. *Clin Calcium*. 2005; 15:577-82.
- Mautalen CA. Osteoporosis in Argentina. *Clin Calcium*. 2001;11: 496-8.

10. O'Neill T, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis J, Silman A. The prevalence of vertebral deformity in European men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1010-8.
11. Uitterlinden AG, Fang Y, Bergink AP, Van Meurs JB, Van Leeuwen HP, Pols HA. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;197:15-21.
12. McGuigan FE, Armbrecht G, Smith R, Felsenberg D, Reid DM, Ralston SH. Prediction of osteoporotic fractures by bone densitometry and COLIA1 genotyping: A prospective, population-based study in men and women. *Osteoporosis Int*. 2001; 12:91-6.
13. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6665-9.
14. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367:284-7.
15. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor alleles (correction). *Nature*. 1997;387:106.
16. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1841-9.
17. Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, et al. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporosis Int*. 1999;9:55-64.
18. Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, Fielding LJ, Ridout R, Cole DEC. Determinants of peak bone mass in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res*. 1999;14:633-43.
19. Ferrari S, Rizzoli R, Slosman D, Bonjour J. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *J Bone Miner Res*. 1998;13:363-70.
20. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, Van Dujin CM, Hofman A, et al. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type 1a1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res*. 2001;16:379-85.
21. Thakkinstian A, Déste C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: Vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res*. 2004;19:419-28.
22. Thakkinstian A, McElduff P, Déste C, Duffy D, Attia J. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med*. 2005;24:1291-306.
23. Harris S, Eccleshall T, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1043-8.
24. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1997;12:915-21.
25. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer E, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000;14:401-20.
26. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Burman CJ, Birkenhäger JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Clin Endocrinol*. 2000;52:211-6.
27. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1256-64.
28. Fang Y, Van Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, Van Dujin CM, Van Leeuwen JP, et al. Cdx-2 polymorphisms in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determine susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*. 2003; 18:1632-41.
29. Liu Y, Liu Y, Recker R, Geng H. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol*. 2003;177:147-96.
30. Uitterlinden A, Fang Y, Van Meurs J, Pols H. Genetic vitamin D receptor polymorphisms and risk of disease. En: Feldman D, Pike J, Glorieux F, editores. *Vitamin D*. San Diego: Elsevier; 2005. p. 1121-57.
31. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J Clin Invest*. 2005;115:3318-25.
32. Willing M, Sowers M, Aron D, Clark M, Burns T, Bunten C, et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res*. 1998;13:695-705.
33. Bandres E, Pombo I, González-Huarriz M, Rebollo A, López G, García-Foncillas J. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ER alpha, Col1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest*. 2005;28:312-21.
34. Miyao M, Morita H, Hosoi T, Kurihara H, Inoue S, Hoshino S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int*. 2000;66: 190-4.
35. Tolosa de Talamoni N. Genética de la osteoporosis. *Rev Arg Endocrinol*. 2002;39S:33-4.
36. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1283-8.
37. Lisker R, López M, Jasqui S, Ponce de León Rosales S, Correa-Rotter R, Sanchez S, et al. Association of vitamin D receptor polymorphisms with osteoporosis in Mexican postmenopausal women. *Human Biol*. 2003;75:399-403.
38. Tolosa de Talamoni N, Pérez A, Ulla M, Elias V, Pretel E, Mammana M, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor and estrogen receptor genes in pre and perimenopausal women from the city of Córdoba, Argentina and surrounding areas: analysis of association with bone mineral density. *Bone*. 2005; 37:127.
39. Tolosa de Talamoni N, Pérez A, Silvano L, Muñoz L, Binci M, Sobrero G, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene is associated to the phenotype and the bone mineral density in patients with Turner syndrome. *Bone*. 2005;36:S249-50.
40. Morrison N. Vitamin D receptor gene variants and osteoporosis: a contributor to the polygenic control of bone density. En: Feldman D, Pike J, Glorieux F, editores. *Vitamin D*. San Diego: Elsevier; 1997. p. 713-31.