

LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D (VDR) MODULAN LA RESPUESTA A LA VITAMINA D DE FORMA TEJIDO ESPECÍFICA

D. ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, M. NAVES DÍAZ, C. GÓMEZ ALONSO Y J.B. CANNATA ANDÍA

SERVICIO DE METABOLISMO ÓSEO Y MINERAL.
INSTITUTO REINA SOFÍA DE INVESTIGACIÓN.
HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS.
OVIEDO. ASTURIAS. ESPAÑA.

En los últimos años se ha discutido el posible papel de los polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D en diferentes enfermedades. En este trabajo se revisan diferentes estudios realizados para determinar la influencia de varios polimorfismos del receptor de la vitamina D y del colágeno tipo I sobre diferentes aspectos relacionados con el metabolismo del hueso y de la glándula paratiroides.

Los estudios epidemiológicos mostraron que la combinación alélica BA_T de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* del receptor de la vitamina D y el genotipo *ss* del polimorfismo *sp1* del colágeno tipo I son predictores del riesgo de fracturas osteoporóticas.

Los estudios experimentales llevados a cabo en los osteoblastos en cultivo indicaron que la combinación alélica ba_T en el receptor de la vitamina D confiere una mayor sensibilidad del osteoblasto ante el estímulo con calcitriol. Por el contrario, en las glándulas paratiroides en cultivo fue la combinación BA_T la que respondió mejor al calcitriol.

La combinación alélica más favorable en el hueso no lo es en la glándula paratiroides y viceversa, lo que indicaría un efecto tejido específico del receptor de la vitamina D en la respuesta al calcitriol.

In the last years, the likely role of the vitamin D receptor polymorphisms in different diseases has been discussed. In this work we review several studies performed to investigate the influence of the vitamin D receptor polymorphisms and type I collagen in different aspects of bone and parathyroid gland metabolism.

On one hand, the epidemiological studies showed that BA_T haplotype from *BsmI*, *ApaI* and *TaqI* polymorphisms in the vitamin D receptor and *ss* genotype in *sp1* polymorphism in type I collagen gene predicted the risk for osteoporotic fractures.

On the other hand, experimental studies carried out in both human primary osteoblasts and parathyroid glands showed that while ba_T haplotype responded better to calcitriol in osteoblasts, BA_T haplotype showed the best response in parathyroid glands.

The most favorable allele combination in the bone is not in the parathyroid gland and vice versa. These findings are indicative of a tissue specific effect of the vitamin D receptor in the response to calcitriol.

PALABRAS CLAVE: fractura, población no seleccionada, COLIA1, calcitriol, cultivo *in vitro*, criopreservación.

KEY WORDS: fracture, non-selected population, COLIA1, calcitriol, *in vitro* culture, cryopreservation.

SISTEMA HORMONAL DE LA VITAMINA D

La vitamina D, a pesar de su nombre, es en realidad un sistema hormonal, formado por diferentes metabolitos interrelacionados. Todos ellos tienen actividad de vitamina D y están también relacionados con la hormona principal del metabolismo óseo y mineral, como es la parathormona (PTH).

Los metabolitos del sistema hormonal de la vitamina D derivan de un precursor común, el colecalciferol o vitamina D₃, que puede bien sintetizarse en la piel a partir

de un derivado del colesterol (7-dehidrocolesterol) por reacciones de isomerización y gracias a la acción de la luz UV_B y la temperatura, o ser ingerido en la dieta¹. La primera reacción enzimática se produce en el hígado donde la vitamina D se hidroxila en el carbono 25 para dar lugar a la 25-hidroxivitamina D₃ o calcidiol [25(OH)D₃]. El calcidiol tiene una vida media larga (3-4 semanas) y hoy en día se considera el mejor marcador de los depósitos de vitamina D en el organismo². La 25(OH)D₃ es el sustrato de la 1 α -hidroxilasa, que cataliza la síntesis del 1,25-dihidroxivitamina D₃ o calcitriol [1,25 (OH)₂D₃] principalmente en el riñón, aunque hoy en día es sabido que esta enzima también se expresa en otros órganos y tejidos en el organismo³. El calcitriol es el metabolito más activo de la vitamina D (más de 100 veces mayor que el calcidiol) pero tiene una vida media corta (pocas horas).

El calcitriol sintetizado en el riñón por la 1 α -hidroxilasa mitocondrial es transportado en la sangre principalmente por la proteí-

na transportadora de vitamina D (DBP) aunque también se une a albúmina y lipoproteínas⁴. Aunque no se conoce todavía el mecanismo por el que el calcitriol entra en la célula diana, sí se sabe que una vez que entra en la misma éste puede bien inactivarse por acción de la 24-hidroxilasa mitocondrial o bien unirse a su receptor, el receptor de vitamina D o VDR que se encuentra libre en el citoplasma celular. La unión de su ligando activa al VDR, que se fosforila⁵ y entra en el núcleo donde se va a unir al receptor del 9-cis retinoide X (RXR) para formar el complejo VDR-RXR. Este complejo reconoce y se une específicamente al ADN en secuencias promotoras de diferentes genes, llamadas elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), además de reclutar numerosos factores de transcripción y otros reguladores que en último término harán que aumente o disminuya la tasa de transcripción de los genes diana.

Las acciones de la vitamina D en los diferentes órganos diana, que clásicamente

Correspondencia: J.B. Cannata Andía.
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral.
Hospital Universitario Central de Asturias.
Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica.
C/ Julián Clavería s/n.
33006 Oviedo.
Correo electrónico: metoseo@hca.es

comprenden el intestino, donde aumenta la absorción de calcio; el hueso, donde aumenta tanto la resorción como la formación ósea; el riñón, donde estimula su propia síntesis y la paratiroides, donde inhibe la síntesis y la secreción de PTH, van a depender de diferentes factores: *i)* niveles de metabolitos (calcidiol y calcitriol), *ii)* presencia de moduladores (coactivadores y correpresores) y *iii)* aspectos cuantitativos y cualitativos del VDR.

RECEPTOR DE VITAMINA D. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

En humanos, el gen del VDR se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 y comprende una región de aproximadamente 100 kb de ADN aunque sólo 4,6 kb son los que codifican la proteína^{6,7}. La proteína VDR es una fosfoproteína de 427 aminoácidos y 48 kDa en la que se reconocen 2 dominios fundamentales, uno de unión al ADN (DBD) y otro de unión al ligando (calcitriol) (LBD).

Como se describe en el apartado anterior, la respuesta de los diferentes órganos diana a la vitamina D depende no sólo de la cantidad y biodisponibilidad de VDR (aspectos cuantitativos) sino también de cómo es dicho receptor (aspectos cualitativos). *Niveles de VDR:* Los niveles intracelulares de VDR se regulan tanto por ligandos del VDR como por hormonas y factores de crecimiento que no unen VDR⁸. La regulación, que afecta al control de la transcripción y la estabilización del ARNm del VDR así como a la síntesis y degradación de la proteína, es específica en cada tejido o célula ya que el calcitriol regula al alza la transcripción del VDR en las glándulas paratiroides y el riñón y no en el intestino⁹.

La cantidad de VDR en la célula diana depende también de muchos otros factores, como el estado de proliferación y diferenciación de la célula, las rutas celulares activadas en un determinado momento así como la expresión diferencial de cofactores que intervienen en las acciones del VDR como factor de transcripción⁸.

Calidad/variabilidad del VDR: Tan importante como la cantidad y disponibilidad del VDR es la calidad de éste. Además de

14 mutaciones diferentes asociadas con rasgos resistentes a vitamina D¹⁰, también se han descrito hasta la fecha más de 14 polimorfismos diferentes en el gen humano del VDR¹¹ que pueden actuar modulando la respuesta a la vitamina D en los diferentes órganos diana. De entre todos los polimorfismos descritos, los más estudiados son 4 SNP (polimorfismo de cambio de nucleótido único) que se nombran con la enzima de restricción que permitió su identificación y son: *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* y *FokI*. Se ha sugerido una relación entre la presencia de determinados alelos y diferentes aspectos del metabolismo óseo¹²⁻¹⁷ y la glándula paratiroides¹⁸⁻²¹, así como la asociación con diferentes enfermedades²²⁻²⁵.

POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE VITAMINA D Y HUESO

La vitamina D lleva a cabo numerosas funciones en el hueso a través de su VDR ya que actúa directamente sobre los osteoblastos y sobre los precursores de los osteoclastos y por lo tanto interviene activamente tanto en la formación como en la resorción ósea.

Aunque hoy en día se pone en entredicho el concepto extendido en la última década en relación a que la carga genética pueda condicionar hasta en un 80% los valores de masa ósea de un individuo, todavía se considera que el genotipo juega un papel muy importante en el metabolismo óseo, con la consiguiente importancia para la presencia de osteoporosis y su consecuencia, la fractura ósea. En la última década se han intentado encontrar genes que contribuyan al desarrollo y mantenimiento de la masa ósea y se ha estudiado el posible efecto de sus variantes genéticas en dicho desarrollo^{26,27}. Sin duda el gen más estudiado en este sentido ha sido el gen del VDR dada la importancia de la vitamina D (de sus acciones a través del VDR) en el metabolismo óseo.

La casi totalidad de los trabajos publicados sobre el efecto de los polimorfismos en el VDR sobre el metabolismo del hueso son estudios epidemiológicos llevados a cabo en diferentes poblaciones en los que se estudiaba la relación entre los diferen-

tes alelos y la masa ósea (DMO) o la presencia de fracturas osteoporóticas. Sin embargo, los trabajos experimentales en sistemas *in vitro* han sido muy escasos.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los resultados publicados sobre el efecto de los polimorfismos del VDR en el metabolismo del hueso y más concretamente en los valores de masa ósea y riesgo de fracturas osteoporóticas han sido contradictorios, quizás debido a factores genéticos (desequilibrio de ligamiento), a la falta de homogeneidad de las muestras (sesgos en la selección y/o tamaño muestral insuficiente), a la falta de atención sobre factores ambientales y a no tener en cuenta los niveles de vitamina D¹⁴. Además, la mayoría de los estudios se han realizado en mujeres y existen pocos resultados en hombres. Sin embargo, y pese a las grandes discrepancias, los resultados de la mayoría de los estudios se han agrupado en dos metaanálisis que concluyen que de alguna manera los genotipos *bb*, *aa* y *TT* o en definitiva la presencia del haplotipo *baT* (según clasificación de Uitterlinden et al²⁸), están asociados a una mayor DMO^{17,26}.

Resultados de nuestro grupo^{15,29} han ido en la misma dirección a lo publicado originalmente por Morrison et al¹³ y los dos metaanálisis ya mencionados^{17,26}, aunque otros autores no hayan encontrado asociación alguna^{30,31} y otros una asociación inversa (alelos *B*, *A* y *t* mayor DMO y protectores frente a fracturas)^{28,32}. La población que participó en nuestros estudios estaba formada por 326 individuos normales seleccionados al azar, todos mayores de 55 años y seguidos durante un período de 8 años procedentes del estudio EVOS-EPOS¹⁵. Se observaron diferencias a nivel de la DMO en las mujeres (*n* = 162), de manera que la presencia del genotipo *bb* frente a la combinación de los otros dos (*B-*) mostró una mayor DMO en valores absolutos y cuando se presentó como Z-score, tanto a nivel lumbar como de cuello de fémur¹⁵. Además, la evolución de la DMO en cuello de fémur también fue significativamente mejor en aquellas mujeres con genotipo *bb*¹⁵. En el caso de los varones (*n* = 164), aunque no se observaron diferencias a nivel de la DMO¹⁵, sí se encontraron

diferencias en las fracturas vertebrales prevalentes, de manera que aquéllos con el haplotipo baT presentaban menor porcentaje de fracturas²⁹. Además, al añadir las fracturas osteoporóticas incidentes no vertebrales al estudio se obtuvieron los mismos resultados²⁹.

El complejo calcitriol-VDR participa en la regulación de la transcripción del gen de la osteocalcina, una de las principales proteínas involucradas en la formación ósea, en los osteoblastos³³. Los primeros estudios del posible efecto de los polimorfismos del VDR sobre el metabolismo del hueso se hicieron sobre los niveles séricos de osteocalcina, encontrándose una gran asociación entre los alelos de los polimorfismos en *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* y los niveles plasmáticos de osteocalcina, ajustados por edad y sexo, en una cohorte de 91 controles sanos³⁴. A partir de entonces se llevaron a cabo varios estudios clínicos y como ocurría con la DMO y las fracturas, hay gran heterogeneidad en los resultados ya que algunos encontraron asociación entre los niveles de osteocalcina y los polimorfismos del gen del VDR^{16,35}, mientras que otros no encontraron asociación alguna³⁶⁻³⁸. Sin embargo, estas diferencias podrían deberse a diferencias en las poblaciones estudiadas.

Howard et al^{37,39} encontraron, tras la estimulación con calcitriol, niveles séricos de osteocalcina más elevados en individuos con genotipo *bb* comparados con los *BB*. Sin embargo, Graafmans et al⁴⁰ no encontraron ningún efecto del polimorfismo *BsmI* sobre los niveles de osteocalcina, si bien su estudio era muy diferente y sólo valoró mujeres mayores de 70 después de un año con suplemento oral de vitamina D. Otros autores han encontrado resultados en el mismo sentido que Howard et al^{41,42}, aunque no siempre se ha podido observar algún efecto de los polimorfismos del gen del VDR sobre los niveles de osteocalcina sérica^{40,43,44} e incluso algunos han encontrado el efecto contrario^{31,34,45,46}. No obstante, en apoyo al efecto favorecedor del *bb*, resultados de nuestro laboratorio en la cohorte no seleccionada descrita anteriormente se observó que los individuos con genotipos favorables *bb*, *aa* y *TT* presentaron niveles de osteocalcina significativamente superiores a aquéllos en los que estaban presentes los alelos des-

favorables (*B*, *A* y *t*). Todo ello cuando se seleccionaba la población con niveles de 25(OH)D adecuados (> 35 ng/mL). Este dato tiene gran importancia dado que demuestra la necesidad de una mayor homogeneidad en los niveles de metabolitos de vitamina D al analizar diferencias de los polimorfismos en el gen de su receptor.

En resumen, existe una gran variabilidad en los resultados de los estudios de la influencia de los polimorfismos del gen del VDR, sobre los niveles de osteocalcina, la masa ósea y el riesgo de fracturas osteoporóticas. Esta disparidad de resultados es multifactorial. La falta de homogeneidad de las poblaciones estudiadas con tamaños muestrales insuficientes y sesgos en la selección, el no tener en cuenta los niveles de calcitriol y/o calcidiol, así como una falta de atención sobre la variabilidad de los factores ambientales han sido los principales factores de confusión¹⁴. Por todo esto, estudios experimentales, en los que a pesar de sus limitaciones y la prudencia que hay que tener en las extrapolaciones, se pueden controlar muchas variables, ayudan a esclarecer el verdadero papel de los polimorfismos del VDR sobre el metabolismo del hueso.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Teniendo en cuenta el importante efecto del gen del VDR en la regulación del gen de la osteocalcina, parece razonable pensar que diferentes polimorfismos del gen del VDR podrían modular la secreción de la misma. Sin embargo, sólo se han publicado hasta el momento dos trabajos en sistemas experimentales donde se estudie *in vitro* el efecto de los polimorfismos del VDR sobre la secreción de osteocalcina^{47,48}. Ohtera et al⁴⁷ cultivaron osteoblastos humanos *in vitro* procedentes de 18 mujeres sometidas a coxartrosis de cadera y encontraron que aquéllas con genotipos *bbaaTT* y *bbAaTT* respondían mejor que las *BbAaTt* cuando los osteoblastos se estimulaban con calcitriol 10⁻⁸ M.

El otro trabajo con osteoblastos en cultivo se llevó a cabo en nuestro laboratorio⁴⁸. Se cultivaron osteoblastos procedentes de 24 pacientes (13 hombres y 11 mujeres) sometidos a extracción de cabeza femoral por

coxartrosis de cadera. Tras la estimulación con calcitriol 10⁻⁹ M y 10⁻⁸ M, se determinó la osteocalcina secretada corregida por contenido total de ADN o proteínas, y se comparó frente a la secreción de osteocalcina en osteoblastos cultivados con calcitriol 10⁻¹⁰ M, concentración de calcitriol que está en rango fisiológico.

La distribución genotípica de los distintos polimorfismos del gen del VDR en la población de osteoblastos cultivados fue similar a la observada en la población que participó en el estudio epidemiológico descrito previamente²⁹ y a datos publicados en otras poblaciones españolas^{49,50}. En la muestra estudiada, los diferentes genotipos y el sexo tuvieron efecto sobre la secreción de osteocalcina.

Los osteoblastos respondieron de forma diferente según los diferentes polimorfismos del VDR. La presencia de los alelos *b* o *T* y el genotipo *aa*, en definitiva el haplotipo baT, se asoció a una mayor secreción de osteocalcina después de la estimulación del osteoblasto con calcitriol (10⁻⁹ M). Al aumentar la concentración de calcitriol (10⁻⁸ M), sólo se mantuvieron las diferencias en el polimorfismo *BsmI*. La consistencia de los resultados, expresados como secreción de osteocalcina tanto en relación a proteínas totales como contenido total de ADN, excluye un efecto apoptótico en las células óseas, como ha sido sugerido⁵¹. El polimorfismo *FokI* no influyó en la respuesta de los osteoblastos al calcitriol. La diferencia con respecto a los otros polimorfismos no debe extrañar ya que el *FokI* está en una región alejada del resto, mientras que existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos *BsmI*, *TaqI* y *ApaI*. Otros autores tampoco han encontrado ningún efecto de este polimorfismo sobre los niveles de osteocalcina sérica en estudios *in vivo*^{16,46,52}.

El análisis multifactorial de los resultados obtenidos en los cultivos de osteoblastos mostró una influencia del sexo en la secreción de osteocalcina. Con la mayor concentración de calcitriol (10⁻⁸ M) se observó que los hombres secretaron más osteocalcina que las mujeres. Estos resultados concuerdan con el estudio epidemiológico que se llevó a cabo en nuestro laboratorio²⁹ y otros estudios^{15,53} donde se observó que, en los resultados de DMO y fracturas, los polimorfismos del gen del

VDR se comportan de manera diferente en hombres y en mujeres. La edad no mostró efecto alguno en nuestro estudio a diferencia de lo descrito por otros autores que encontraron una disminución en la secreción de osteocalcina con la edad^{54,55}.

El conjunto de los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre el efecto de los polimorfismos del VDR en el hueso parecen indicar, de acuerdo con los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, que el haplotipo baT sería el que confiere una mayor sensibilidad al osteoblasto ante el estímulo con calcitriol.

POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE VITAMINA D Y GLÁNDULAS PARATIROIDES

Además del posible efecto de los polimorfismos del gen del VDR sobre masa ósea y fracturas, es importante considerar su posible papel regulador en la paratiroides.

El calcitriol actúa en las glándulas paratiroides a través del VDR donde es capaz de inhibir la síntesis y la secreción de PTH así como la proliferación de las células paratiroides⁸. Además, el calcitriol modula positivamente la síntesis del VDR de manera que una disminución en los niveles de calcitriol implica una menor cantidad y por tanto disponibilidad de su receptor, constituyendo uno de los principales factores etiopatogénicos del desencadenamiento y la progresión del hiperparatiroidismo secundario⁵⁶.

La regulación positiva por ligando, unida a la disminución en los niveles de VDR descrita en el hiperparatiroidismo secundario^{57,58}, hacen que sea de vital importancia que el VDR tenga gran afinidad por el ligando y por el ADN así como una vida media larga; en definitiva, que haya una buena disponibilidad y calidad de VDR que redundaría en una adecuada respuesta por parte de las glándulas paratiroides. La cantidad y calidad de VDR podría a su vez estar modulada por sus polimorfismos genéticos.

Carling et al^{59,60} fueron los primeros en proponer una relación directa entre los polimorfismos del VDR y la función paratiroidea ya que encontraron que en pacien-

tes con hiperparatiroidismo primario predominaba la presencia del haplotipo baT o los genotipos *bb*, *aa* y *TT*⁶⁰. Además, también encontraron que el haplotipo baT está asociado a un mayor trastorno en la secreción de PTH por parte de células paratiroides en cultivo procedentes de adenomas, de manera que en las células de estos pacientes la supresión de PTH al aumentar la concentración extracelular de calcio era menor que en las células procedentes de pacientes con el haplotipo BA⁶¹. Por otro lado, pacientes con hiperparatiroidismo primario homocigotos *bb*, *aa* o *TT* presentaban en células paratiroides mayores niveles de ARNm de PTH y menores niveles de ARNm de VDR que los pacientes con los genotipos *BB*, *AA* o *tt*, sin encontrarse diferencias en el tamaño de la glándula ni en los niveles séricos de calcio y PTH¹⁸. Sin embargo, otros autores no han podido encontrar esta relación tan directa entre los polimorfismos del VDR y el hiperparatiroidismo primario^{62,63}.

En población normal hay muy pocos estudios. Howard et al^{17,39} describieron niveles más elevados de PTH y una mejor respuesta al calcitriol en mujeres premenopáusicas caucásicas con genotipo *BB* que en las de genotipo *bb*. Lorentzon et al¹⁶ encontraron en adolescentes sanas caucásicas que aquéllas con el genotipo *Aa* tenían niveles de PTH más elevados que las que tenían *aa*.

Aunque Carling et al⁶⁰ y otros autores^{64,65} no encontraron asociación en el hiperparatiroidismo secundario, Fernández et al⁴⁹, y otros autores^{66,67} sí han encontrado asociación, con resultados similares a los hallados en el hiperparatiroidismo primario (niveles más elevados de PTH en el genotipo *bb*). En la misma dirección Yokoyama et al²¹ han encontrado niveles más elevados de PTH en pacientes en hemodiálisis con el genotipo *aa* frente a los que tienen *A-*. Por otra parte, Vigo et al⁶⁸ encontraron niveles más elevados de PTH en pacientes renales españoles con el genotipo *FF* que en los individuos *F-*, aunque estas diferencias no las observaron en controles sanos. Estos resultados podrían ayudar a explicar las diferencias observadas en la respuesta al tratamiento con similares dosis de calcitriol en pacientes con el mismo grado de hiperparatiroidismo secundario.

Existen estudios, la gran mayoría *in vivo*, sobre el efecto directo del calcitriol y el posible papel de los polimorfismos de su receptor en los diferentes órganos diana. Sin embargo hay pocos estudios que hayan analizado este efecto *in vitro* y ninguno que lo haya hecho en glándulas paratiroides, ya que hasta la fecha no se disponía de una línea celular o un cultivo primario celular o tisular de larga duración que permitiera estudios funcionales con calcitriol.

En nuestro laboratorio se puso a punto un sistema de cultivo *in vitro* de glándulas paratiroides a medio-largo plazo⁶⁹ con el fin de poder hacer estudios funcionales con calcitriol y estudiar el efecto de los polimorfismos genéticos del VDR sobre la respuesta al calcitriol. La imposibilidad de poder contar con tejido humano suficiente para llevar a cabo la puesta a punto del sistema de cultivo, hizo que éste se estableciera en una fase inicial utilizando glándulas paratiroides de rata con función renal normal.

Los resultados de la puesta a punto del modelo mostraron que, en las condiciones apropiadas (medio de cultivo no suplementado descrito por Almadén et al⁷⁰), el tejido paratiroideo de rata cultivado *in vitro* inmediatamente tras su extracción, mantiene su viabilidad durante 6 días en cultivo, con viabilidades celulares por encima del 80%, y su funcionalidad, medida ésta como secreción basal de PTH y respuesta al calcio y al calcitriol, durante 4 días en cultivo⁶⁹. Sin embargo si las glándulas se cultivan después de haber sido criopreservadas, aunque mantienen su viabilidad y capacidad de secretar PTH intactas, pierden la capacidad de respuesta al calcio⁶⁹. Una vez que fueron establecidas las condiciones de cultivo, se realizaron experimentos de viabilidad y de respuesta al calcio y al calcitriol en glándulas paratiroides humanas procedentes de pacientes con hiperparatiroidismo secundario severo sometidos a paratiroidectomía, cultivadas tanto en fresco como tras su criopreservación. Los experimentos de respuesta al calcitriol sirvieron para el estudio del efecto de los polimorfismos genéticos del VDR sobre la respuesta de las glándulas paratiroides a dicha hormona.

Las glándulas humanas se cultivaron durante 60 horas, período durante el cual mantuvieron una viabilidad celular superior al

80%, tanto las glándulas cultivadas en fresco como las cultivadas tras su criopreservación. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el tejido de rata⁶⁹ y también a los descritos por otros autores aunque en cultivos de sólo 24 horas⁷¹. Las glándulas humanas procedentes de pacientes con hiperparatiroidismo secundario mantuvieron además la capacidad de secretar PTH de manera estable, sin encontrarse diferencias entre el tejido fresco y el criopreservado, durante 60 horas en cultivo. Otros autores tampoco encontraron diferencias entre las glándulas cultivadas en fresco o tras su criopreservación pero en experimentos a muy corto plazo (2 horas)⁷².

Un 80% de las glándulas cultivadas en fresco fueron capaces de aumentar la secreción de PTH al disminuir la concentración de calcio en el medio de incubación. Sin embargo, al igual que ocurrió en las glándulas de rata⁶⁹, las glándulas paratiroides humanas criopreservadas no fueron capaces de responder al calcio en cultivo. Estos resultados sugieren que el método de criopreservación utilizado debe de afectar de alguna manera a las rutas de señalización del calcio. Aunque estudios previos, que utilizaron el mismo método de criopreservación, no encontraron ningún efecto negativo en la criopreservación^{72,73}, dichos estudios tenían la limitación de ser experimentos a muy corto plazo (2 horas). En nuestro caso, tanto en ratas como en humanos, se estudió la respuesta al calcio durante períodos más largos, 96 y 60 horas respectivamente, sin que se encontraran resultados positivos en ningún caso. Sin embargo, esta pérdida de respuesta observada en el tejido criopreservado parece mayor a la que se observa en la práctica clínica aunque se utiliza tejido conservado en las mismas condiciones y puede deberse a que el proceso de criopreservación impide que la glándula se recupere de la disminución de la expresión del receptor de calcio descrita a las 24 horas en cultivo⁷⁴ a diferencia de las glándulas cultivadas en fresco.

Los resultados de la respuesta de las glándulas paratiroides humanas al estímulo con calcitriol mostraron que en algunos casos, ni la menor concentración de calcitriol utilizada (10^{-9} M) —equivalente al pico máximo alcanzado en pacientes en

tratamiento con calcitriol^{75,76}— ni la mayor (10^{-8} M) fueron capaces de inhibir la secreción de PTH. El porcentaje de glándulas que no respondió (35%) se encuentra en el rango de los resultados que se observan en la clínica en pacientes con hiperparatiroidismo secundario severo tratados con calcitriol intravenoso^{76,77}.

No se encontraron diferencias significativas en la magnitud de la inhibición de la PTH por calcitriol entre glándulas con crecimiento difuso y glándulas con crecimiento nodular. Sin embargo, el rango de inhibición encontrado en las glándulas nodulares fue ligeramente mayor al encontrado en las difusas, que se comportaron de una forma más homogénea.

El efecto inhibitorio del calcitriol sobre la secreción de PTH se debió exclusivamente al efecto del calcitriol, ya que tanto el calcio como el fósforo se mantuvieron estables durante todo el período de cultivo. Nuestros resultados, en los que aparecen glándulas que no fueron capaces de responder al calcitriol, refuerzan el hecho de que la concentración de calcitriol no es el único factor limitante en la respuesta de las glándulas. Como otros autores han descrito^{57,58,78}, la pérdida de respuesta puede deberse a la disminución en los niveles de VDR que ocurre cuando las glándulas paratiroides se vuelven hiperplásicas. Además, las diferencias encontradas en la homogeneidad de la respuesta entre glándulas nodulares y difusas pueden ser un reflejo de los cambios en la expresión génica⁷⁹ y las aberraciones cromosómicas⁸⁰ que se producen en la evolución de crecimiento difuso a crecimiento nodular.

Los resultados en los cultivos con glándulas criopreservadas mostraron que éstas son capaces de responder al calcitriol de la misma manera que lo hacen las que se cultivan en fresco, sin que hubiera diferencias significativas entre ambas. Sólo hubo una ligera diferencia en la magnitud de la inhibición de la PTH entre las dos concentraciones de calcitriol (10^{-9} M y 10^{-8} M), lo cual refuerza la hipótesis de que una vez que se inhibe la PTH con una concentración suficiente de calcitriol, el beneficio esperado no se incrementa aumentando la concentración de éste.

El hecho de que las glándulas criopreservadas fueran capaces de responder al calcitriol y no al calcio sugiere que el proce-

so de criopreservación puede afectar a los mecanismos de respuesta al calcio pero no al calcitriol, quizá debido a la diferente localización de los dos receptores y/o a diferentes rutas de señalización intracelular.

Este modelo de cultivo nos permitió analizar el efecto de los polimorfismos del gen del VDR sobre la respuesta glandular al calcitriol y se pudieron mantener bajo control otras variables implicadas en la modulación de la glándula paratiroides como el calcio y el fósforo.

Las frecuencias genotípicas encontradas en la población de pacientes paratiroidectomizados⁸¹ no se diferenciaron de las encontradas en las poblaciones de los otros estudios de este trabajo, ni tampoco de otras poblaciones similares^{49,65,82}.

No se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas en ninguno de los polimorfismos estudiados (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI* y *FokI*) entre las glándulas que respondieron o las que no respondieron al tratamiento con calcitriol, ni tampoco se encontraron diferencias en la respuesta al calcitriol en los cuatro polimorfismos estudiados cuando se analizaron de forma independiente⁸¹. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que tampoco encontraron ningún efecto de los polimorfismos del VDR sobre la glándula paratiroides⁶²⁻⁶⁵.

Sin embargo, las glándulas de pacientes con haplotipo BA_T, comparado con los ba_T, respondieron ligeramente mejor al calcitriol cuando se utilizó la mayor de las concentraciones (10^{-8} M) ($p = 0,07$). En el mismo sentido, Marco et al²⁰ encontraron que pacientes renales con el genotipo BB respondieron mejor al calcitriol que pacientes con el genotipo bb.

Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que el alelo *b* ha sido asociado con niveles más bajos de ARNm del VDR por disminución de la transcripción y la estabilidad del mensajero¹³. Así, niveles menores de VDR en la paratiroides de los individuos bb contribuirían a una peor respuesta al calcitriol y por lo tanto favorecerían la hiperplasia de la glándula y los niveles séricos más elevados de PTH⁸³.

Los resultados en las glándulas paratiroides son opuestos a los encontrados en los osteoblastos, donde el haplotipo ba_T mostró una mejor respuesta al calcitriol, con lo que se demostró que al menos parte de

esta respuesta al calcitriol a través de su receptor VDR podría estar mediada por la «calidad o cualidad» de éste; en definitiva, asociada a la carga genética del individuo.

CONCLUSIONES

En resumen, este trabajo clínico-epidemiológico y experimental parece indicar que la combinación alélica más favorable en el hueso (baT) no lo es en la glándula paratiroides y viceversa, lo que indicaría que la heterogeneidad alélica, surgida de las interacciones genotipo-ambiente, se manifestaría de tal manera que un mismo alelo se comporte de distinta forma en ambientes diferentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN) y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS: 2000/0008-02). Daniel Álvarez Hernández está contratado por la FICYT (Fundación para el fomento en Asturias de la Investigación Científica aplicada y la Tecnología) al ser beneficiario del programa BEFI (número de expediente: 03/00099) del FIS (Fondo de Investigaciones sanitarias).

BIBLIOGRAFÍA

- Holick M. Vitamin D: photobiology, metabolism, and clinical applications. En: Burger H, editor. Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p. 990-1013.
- Álvarez-Hernández D, Gómez-Alonso C, Cannata-Andía JB. Vitamin D supplementation: What is right? Clinical cases in mineral and bone metabolism. 2006;3:71-5.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol. 2005;289:F8-28.
- Dusso AS. Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. Kidney Int. 2003; Suppl:S6-9.
- Chatterjee M. Vitamin D and genomic stability. Mutat Res. 2001;475:69-87.
- Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. Mol Endocrinol. 1997;11:1165-79.
- Taymans SE, Pack S, Pak E, Orban Z, Barsony J, Zhuang Z, et al. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. J Bone Miner Res. 1999;14:1163-6.
- Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. Am J Physiol. 1999;277:F157-75.
- Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. Endocrinology. 1995;136:1419-25.
- Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A, Takeyama K. Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. Horm Res. 2002;57:73-8.
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene. 2004;338:143-56.
- Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, et al. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Iα1 gene in susceptibility for fracture. J Bone Miner Res. 2001;16:379-85.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature. 1994;367:284-7.
- Gómez Alonso C, Naves Díaz ML, Díaz-Corte C, Fernández Martín JL, Cannata Andía JB. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms: effect on bone mass, bone loss and parathyroid hormone regulation. Nephrol Dial Transplant. 1998;13 Suppl 3:73-7.
- Gómez C, Naves ML, Barrios Y, Díaz JB, Fernández JL, Salido E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. Osteoporos Int. 1999;10:175-82.
- Lorentzon M, Lorentzon R, Nordstrom P. Vitamin D receptor gene polymorphism is related to bone density, circulating osteocalcin, and parathyroid hormone in healthy adolescent girls. J Bone Miner Metab. 2001;19:302-7.
- Thakkinstian A, D'Este 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.
- Carling T, Rastad J, Akerstrom G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:2255-9.
- Jofre R. Polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene and parathyroid function. Nefrologia. 2001;21 Suppl 1:51-5.
- Marco MP, Martínez I, Betriu A, Craver L, Fíbla MJ, Fernández E. Influence of BsmI vitamin D receptor gene polymorphism on the response to a single bolus of calcitriol in hemodialysis patients. Clin Nephrol. 2001;56:111-6.
- Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T, Ogura Y, Takemoto F, Hara S, et al. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. Kidney Int. 1998;53:454-8.
- Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:3:137-40.
- Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. J Dermatol Sci. 2002;30:167-71.
- Slattery ML, Neuhausen SL, Hoffman M, Caan B, Curtin K, Ma KN, et al. Dietary calcium, vitamin D, VDR genotypes and colorectal cancer. Int J Cancer. 2004;111:750-6.
- Wilkinson RJ, Llewellyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. Lancet. 2000;355:618-21.
- Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. J Endocrinol. 2003;177:147-96.
- Brown MA, Duncan EL. Genetic studies of osteoporosis. Expert Rev Mol Med. 1999;1999:1-18.
- Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. J Bone Miner Res. 1996;11:1:241-8.
- Álvarez-Hernández D, Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Santamaría I, Cannata-Andía JB. Influence of polymorphisms in VDR and COL1A1 genes on the risk of osteoporotic fractures in aged men. Kidney Int. 2003;63 Suppl:14-8.
- Eccleshall TR, Garner P, Gross C, Delmas PD, Feldman D. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. J Bone Miner Res. 1998;13:31-5.
- 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.
- Houston LA, Grant SF, Reid DM, Ralston SH. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. Bone. 1996;18:249-52.
- Lian J, Staal A, van Wijnen A, Stein J, Stein G. Biological and Molecular Effects of Vitamin D on Bone. En: Holick M, editor. Vitamin D: physiology, molecular biology, and clinical applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 1999. p. 175-93.
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating

- osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6665-9.
35. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1003-9.
36. Zhao J, Zhou X, Meng X, Liu G, Xing X, Liu H, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese. *Chin Med J (Engl)*. 1997;110:366-71.
37. Howard G, Nguyen T, Morrison N, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. Notification of genotype corrections. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1043.
38. Bagger YZ, Hassager C, Heegaard AM, Christiansen C. Vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphisms in postmenopausal Danish women: no relation to bone markers or serum lipoproteins. *Climacteric*. 2000;3:84-91.
39. Howard G, Nguyen T, Morrison N, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2800-5.
40. Graafmans WC, Lips P, Ooms ME, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1241-5.
41. Kroger H, Mahonen A, Ryhanen S, Turunen AM, Alhava E, Maenpaa P. Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density. *Lancet*. 1995;345:1238; author reply 1239.
42. McClure L, Eccleshall TR, Gross C, Villa ML, Lin N, Ramaswamy V, et al. Vitamin D receptor polymorphisms, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res*. 1997;12:234-40.
43. Hansen TS, Abrahamsen B, Henriksen FL, Hermann AP, Jensen LB, Horder M, et al. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish perimenopausal women. *Bone*. 1998;22:571-5.
44. Fleet JC, Harris SS, Wood RJ, Dawson-Hughes B. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. *J Bone Miner Res*. 1995;10:985-90.
45. Ferrari S, Manen D, Bonjour JP, Slosman D, Rizzoli R. Bone mineral mass and calcium and phosphate metabolism in young men: relationships with vitamin D receptor allelic polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2043-8.
46. Van Pottelbergh I, Goemaere S, De Bacquer D, De Paepe A, Kaufman M. Vitamin D receptor gene allelic variants, bone density, and bone turnover in community-dwelling men. *Bone*. 2002;31:631-7.
47. Ohtera K, Ishii S, Matsuyama T. Influence of the vitamin D receptor alleles on human osteoblast-like cells. *J Bone Joint Surg Br*. 2001;83:134-8.
48. Naves M, Álvarez-Hernández D, Fernández-Martín JL, Paz-Jiménez J, García-Prado P, Fernández-Coto T, et al. Effect of VDR gene polymorphisms on osteocalcin secretion in calcitriol-stimulated human osteoblasts. *Kidney Int*. 2003;63:S23-7.
49. Fernández E, Fibla J, Betriu A, Piulats JM, Almirall J, Montoliu J. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1546-52.
50. Marco MP, Martínez I, Amoedo ML, Borrás M, Saracho R, Almirall J, et al. Vitamin D receptor genotype influences parathyroid hormone and calcitriol levels in predialysis patients. *Kidney Int*. 1999;56:1349-53.
51. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*. 1998;13:793-802.
52. Bell NH, Morrison NA, Nguyen TV, Eisman J, Hollis BW. ApaI polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. *J Lab Clin Med*. 2001;137:133-40.
53. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:608-17.
54. Martínez ME, Medina S, Sánchez M, Del Campo MT, Esbrit P, Rodrigo A, et al. Influence of skeletal site of origin and donor age on 1,25(OH)₂D₃-induced response of various osteoblastic markers in human osteoblastic cells. *Bone*. 1999;24:203-9.
55. Martínez P, Moreno I, De Miguel F, Vila V, Esbrit P, Martínez ME. Changes in osteocalcin response to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulation and basal vitamin D receptor expression in human osteoblastic cells according to donor age and skeletal origin. *Bone*. 2001;29:35-41.
56. Llach F, Velásquez Forero F. Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure: pathogenic and clinical aspects. *Am J Kidney Dis*. 2001;38 Suppl 5:S20-33.
57. Dusso AS, Thadhani R, Slatopolsky E. Vitamin D receptor and analogs. *Semin Nephrol*. 2004;24:10-6.
58. Carling T, Rastad J, Szabo E, Westin G, Akersstrom G. Reduced parathyroid vitamin D receptor messenger ribonucleic acid levels in primary and secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2000-3.
59. Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, et al. Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat Med*. 1995;1:1309-11.
60. Carling T, Kindmark A, Hellman P, Holmberg L, Akersstrom G, Rastad J. Vitamin D receptor alleles b, a, and T: risk factors for sporadic primary hyperparathyroidism (HPT) but not HPT of uremia or MEN 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:329-32.
61. Carling T, Ridefelt P, Hellman P, Rastad J, Akersstrom G. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1772-5.
62. Menarguez J, Goicoechea M, Cristóbal E, Arribas B, Martínez ME, Alcázar JA, et al. Lack of relationship between BsmI vitamin D receptor polymorphism and primary hyperparathyroidism in a Spanish female population. *Calcif Tissue Int*. 1999;65:214-6.
63. Nagasaka S, Ishikawa S, Matoba H, Kubota K, Murakami T, Saito T. Vitamin D receptors and hyperparathyroidism. *Nat Med*. 1996;2:834.
64. McCarey D, Spooner R, Jagger C, McLellan AR, Jardine AG. The BSM-1 vitamin D receptor polymorphism and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:811-2.
65. Jofre R, Menarguez J, Polo JR, Arribas B, Cristóbal E, López-Gómez JM, et al. The vitamin D receptor gene polymorphism and parathyroid function. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:1336-7.
66. Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y. Vitamin D receptor gene polymorphisms affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis*. 1998;32:464-9.
67. Giannini S, D'Angelo A, Nobile M, Carraro G, Rigotti P, Silva-Netto F, et al. The effects of vitamin D receptor polymorphism on secondary hyperparathyroidism and bone density after renal transplantation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1768-73.
68. Vigo Gago E, Cadarso-Suárez C, Pérez-Fernández R, Romero Burgos R, Devesa Múgica J, Segura Iglesias C. Association between vitamin D receptor FokI. Polymorphism and serum parathyroid hormone level in patients with chronic renal failure. *J Endocrinol Invest*. 2005;28:117-21.
69. Álvarez-Hernández D, González-Suárez I, Naves M, Carrillo-López N, Fdez-Coto T, Fernández-Martín JL, et al. Long-term response of cultured rat parathyroid glands to calcium and calcitriol: the effect of cryopreservation. *J Nephrol*. 2005;18:141-7.
70. Almaden Y, Canalejo A, Hernández A, Ballesteros E, García-Navarro S, Torres A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res*. 1996;11:970-6.
71. Almaden Y, Hernández A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernández Cruz L, et al. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1845-52.
72. Wells SA, Jr., Christiansen C. The transplanted parathyroid gland: evaluation of cryopre-

73. Wagner PK, Rumpelt HJ, Krause U, Rothmund M. The effect of cryopreservation on hormone secretion in vitro and morphology of human parathyroid tissue. *Surgery*. 1986;99:257-64.
74. Ritter CS, Slatopolsky E, Santoro S, Brown AJ. Parathyroid cells cultured in collagen matrix retain calcium responsiveness: importance of three-dimensional tissue architecture. *J Bone Miner Res*. 2004;19:491-8.
75. Beer TM, Munar M, Henner WD. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer*. 2001;91:2431-9.
76. Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, et al. Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int*. 1994;45:1710-21.
77. Fukagawa M, Kitaoka M, Kurokawa K. Resistance of the parathyroid glands to vitamin D in renal failure: implications for medical management. *Kidney Int*. 1997;62:S60-4.
78. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest*. 1993;92:1436-43.
79. Santamaría I, Álvarez-Hernández D, Jofre R, Polo JR, Menarguez J, Cannata-Andía JB. Progression of secondary hyperparathyroidism involves deregulation of genes related to DNA and RNA stability. *Kidney Int*. 2005;67:2267-79.
80. Afonso S, Santamaría I, Guinsburg ME, Gómez AO, Miranda JL, Jofre R, et al. Chromosomal aberrations, the consequence of refractory hyperparathyroidism: its relationship with biochemical parameters. *Kidney Int*. 2003;S32-8.
81. Álvarez-Hernández D, Naves M, Santamaría I, Menarguez J, Torregrosa V, Cannata J. Response of parathyroid glands to calcitriol in culture: Is this response mediated by the genetic polymorphisms in vitamin D receptor? *Kidney Int*. 2003;63:S19-22.
82. Correa P, Rastad J, Schwarz P, Westin G, Kindmark A, Lundgren E, et al. The vitamin D receptor (VDR) start codon polymorphism in primary hyperparathyroidism and parathyroid VDR messenger ribonucleic acid levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:1690-4.
83. Torres A, Salido E. Vitamin D receptor genotype: its role in bone mass and turnover in non-renal and renal patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12:1811-2.