
Asociación del haplotipo BBAAtt del gen del receptor de la vitamina D con la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

Mariana Zambrano-Morales¹, Lisbeth Borjas², Erika Fernández³, William Zabala¹, Pilar de Romero¹, Lennie Pineda² y Alisandra Morales-Machín².

¹Cátedra de Bioquímica Clínica, Escuela de Bioanálisis,

²Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Genética Médica e

³Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Osteoporosis, genes, RVD, haplotipos.

Resumen. La Osteoporosis (OP) es un problema de salud pública, que afecta a más de 150 millones de personas en el mundo, mayoritariamente mujeres posmenopáusicas. Estudios epidemiológicos demuestran que los factores genéticos podrían representar el 80-90% de la variabilidad en la densidad mineral ósea y en consecuencia relacionarse con el riesgo a sufrir OP. El gen del receptor de la vitamina D (RVD) se ha estudiado ampliamente en este campo y su relación con la osteoporosis ha sido controversial. El objetivo de esta investigación fue estudiar la asociación de los polimorfismos *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* del gen del RVD con la OP en 147 mujeres posmenopáusicas, 71 con OP y 76 sin la enfermedad (control). El análisis molecular se realizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los genotipos BB, AA y tt se encontraron en 56,33, 50,70 y 25,35% y en 21,05, 28,95 y 10,53%, en el grupo con OP y control, respectivamente. El haplotipo BBAAtt se observó en un 23,94% en el grupo con OP y en 5,26% en el grupo control. Este haplotipo resultó ser factor de riesgo para la OP con Razón de disparidad (RD) de 5,66, mientras que el haplotipo BbaaTT, factor de protección (RD: 0,10). Estos hallazgos apoyan la asociación del haplotipo BBAAtt del gen del receptor de la vitamina D con la OP.

Association of the vitamin D receptor gene BBAAtt haplotype with osteoporosis in post-menopausal women.

Invest Clin 2008; 49(1): 29 - 38

Key words: Osteoporosis, genes, vitamin D receptor, haplotype.

Abstract. Osteoporosis (OP) is an important public issue affecting more than 150 millions all over the world, mainly post-menopausal women. Epidemiological studies have shown that the genetic factors could be involved in 80-90% of the bone mineral density variability and therefore, related to the risk of OP manifestations. The vitamin D receptor (VDR) gene has been extensively studied, but its relationship with OP has been controversial. The aim of this investigation was to study the association of *Bsm I*, *Apa I* and *Taq I* VDR gene polymorphism with OP in 147 post-menopausal women; 71 with OP and 76 without the disease (control). The molecular gene analysis was performed using the polymerase chain reaction (PCR). The genotypes BB, AA, and tt were found in 56.33, 50.70 and 25.35% and in 21.05, 28.95 and 10.53% of OP patients and controls respectively. The haplotype BBAAtt was observed in 23.94% of OP patients and 5.26% of the controls. This haplotype was a risk factor for OP, since a odds ratio (OR) of 5.66 was found, while, haplotype BbaaTT was a protection factor (OR: 0.10). These findings support the association of the vitamin D receptor gene BBAAtt haplotype with OP.

Recibido: 30-11-2006. Aceptado: 12-04-2007.

INTRODUCCIÓN

La Osteoporosis ha sido definida por la Canadian Consensus Conference on Osteoporosis como un desorden óseo sistémico caracterizado por una baja densidad mineral ósea (DMO), y deterioro en la microarquitectura del tejido óseo que conlleva a fragilidad y susceptibilidad a fractura (1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) su prevalencia se estima en un 30% de las mujeres caucásicas y en un 8% de los varones mayores de 50 años, y asciende hasta un 50% en mujeres de más de 70 años (2). En Venezuela el 30% de la población mayor de 50 años sufre de OP y 36% tiene osteopenia (3).

La importancia clínica de la OP como enfermedad de salud pública se asocia a las fracturas (4, 5), así como a la elevada mor-

bimortalidad que ocasiona, lo que reduce la expectativa de vida de la población afectada y acarrea un elevado costo (2, 3, 6).

Estudios epidemiológicos en familias y gemelos han demostrado que los factores genéticos podrían representar más del 80% de la variabilidad en la DMO y en consecuencia el riesgo de sufrir OP estaría en gran parte determinado genéticamente. La contribución genética a la masa ósea se observa en todas las edades por lo que se cree que los genes regulan tanto el pico de masa ósea como la tasa de pérdida de hueso (6, 7).

Se han identificado genes candidatos que codifican moléculas u hormonas involucradas en los procesos de regulación ósea, recambio óseo, pico de masa ósea y tasa de pérdida de hueso, entre ellos tenemos: el gen del colágeno tipo I alfa 1, el gen del re-

ceptor de los estrógenos, el gen de la osteocalcina, el gen del receptor de la calcitonina, el gen del receptor de la vitamina D (5, 7, 8).

El gen del receptor de la vitamina D, uno de los más estudiados, está encargado de la regulación de la función osteoclastica y osteoblástica, se encuentra ubicado en el cromosoma 12, en la región 12q12-12q14, y presenta una longitud de 75 Kb distribuidos en 11 exones y 10 intrones. En el extremo 3' del gen, a partir del exón 7 y hasta el exón 9 se han identificado 3 polimorfismos mediante las enzimas de restricción *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* (7).

Morrison y col. fueron los primeros en señalar al gen del RVD como un locus importante en la determinación de la masa ósea, demostrando que los alelos de los polimorfismos del gen del RVD eran funcionalmente diferentes, contribuían a la variabilidad fisiológica de los niveles de osteocalcina e influían en la aceleración de los procesos de remodelado óseo (9, 10).

Por tal razón el estudio de los polimorfismos del gen del RVD constituye un factor genético importante para la identificación de grupos de elevado riesgo a desarrollar la OP, principalmente mujeres posmenopáusicas (6, 9, 11).

El objetivo de este estudio fue determinar la asociación de los polimorfismos *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* del gen del RVD en mujeres con osteoporosis.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudió un grupo de 147 mujeres posmenopáusicas provenientes de la consulta de Ginecología y Endocrinología de los Servicios Médicos Odontológicos de la Universidad del Zulia (LUZ), Hospital Central de Maracaibo, Especialidades Médicas Claret y Unidad de Genética Médica de LUZ de la ciudad de Maracaibo, capital del estado Zulia.

Para la realización de este estudio, se contó con el consentimiento informado de los pacientes analizados y la aprobación del comité de bioética de la Unidad de Genética Médica de LUZ. Se realizó además un cuestionario clínico a cada paciente para recolectar los datos necesarios para la participación en el estudio.

Se seleccionaron mujeres posmenopáusicas nacidas en el estado Zulia, se les practicó la prueba de densitometría ósea por el método de absorciometría dual de rayos X (DEXA), y se les clasificó de acuerdo a la definición operativa de la osteoporosis establecida por la OMS en: 76 mujeres Normales sin OP (Grupo Control) con DMO no más de 1 desviación estándar (DE) por debajo del promedio para adultos jóvenes, y 71 mujeres con OP (Grupo de estudio) por densitometría ósea positiva para la enfermedad, lo que equivale a DMO mayor de 2,5 DE por debajo del promedio para un adulto joven (1, 2, 6, 12).

Para el análisis molecular de los polimorfismos del gen del RVD, se aisló el ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica por técnica combinada derivada del método Fenol-Sevag (13) e Inorgánico (14) desarrollada en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina. Se amplificaron mediante RCP tres secuencias ubicadas en el extremo 3' del gen del RVD. Los iniciadores empleados para los tres polimorfismos han sido descritos previamente (10, 15). La RCP se realizó de la siguiente manera: A cada 100ng de ADN para el polimorfismo *Bsm I* y 250ng para los polimorfismos *Apa I* y *Taq I* se adicionó 20 μ L de mezcla de reacción constituida por 2,5 μ L de Buffer Taq (10X), 1 μ L de cada iniciador (10 μ M), 0,5 μ L de desoxi nucleótido (10 μ M), 2 μ L de Cloruro de magnesio (25mM), 0,5 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L), y 12,5 μ L de agua ultra pura.

Esta técnica fue realizada en un termociclador MJ Research utilizando control negativo en cada amplificación y de acuerdo al siguiente programa: desnaturalización corta de 94°C por 1 minuto, alineamiento de los iniciadores a 55°C para el polimorfismo *Bsm I* y 64°C para los polimorfismos *Apa I* y *Taq I* por 1 minuto, extensión de 72°C por 1 minuto en un total de 25 ciclos. El programa fue precedido por una desnaturalización prolongada a 94°C por 10 minutos y una extensión final de 72°C por 10 minutos. El tamaño de los fragmentos obtenidos correspondió a 825 pares de base (pb) para el polimorfismo *Bsm I*, y 2000 pb para los polimorfismos *Apa I* y *Taq I*.

Los productos amplificados se sometieron a digestión enzimática con las enzimas de restricción *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I*. Los productos digeridos se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en buffer Tris-EDTA-Borato 1x. Se utilizó como marcador de peso molecular P_{gem}. El gel se coloreó con una solución de 5mg/mL de bromuro de etidio, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Hoefler Mod. UVTM-25) y se tomó fotografía con película Polaroid instantánea 667.

Se reportaron genotipos homocigotos BB, AA y TT cuando en ambos cromosomas existió ausencia de corte de las enzimas *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I*. Los genotipos bb, aa y tt se asignaron en caso de la presencia de corte de las enzimas *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* en ambos cromosomas generándose fragmentos de 650 + 175 pb, 1700+300pb y 1800 + 200pb para *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I*, respectivamente. Los genotipos heterocigotos Bb, Aa y Tt se presentaron en el caso de que en un cromosoma existiera ausencia de corte de las enzimas *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* y presencia de corte en el otro.

Con base a las frecuencias genotípicas se estimaron las frecuencias alélicas para cada polimorfismo, y se determinó el ajuste al equilibrio genético de Hardy Weinberg.

La probable asociación entre los polimorfismos estudiados de manera individual y conjunta y los grupos control y con osteoporosis se analizó utilizando la prueba de Ji cuadrado. Para cada polimorfismo y haplotipo resultante se calculó la RD, conocida como "odds ratio", la cual indica cuanto más riesgo de presentar una patología tienen las personas que presentan o que están expuestas a un factor de riesgo, en nuestro caso el factor de riesgo era la presencia de uno u otro genotipo u haplotipo y su cálculo se realizó mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), versión.8.1 del SAS Institute, INC, NC (16).

RESULTADOS

Considerando el total de muestras analizadas, se determinaron las frecuencias alélicas de cada polimorfismo. Para el *Bsm I*, el alelo "B" obtuvo una frecuencia de 0,63 y el alelo "b" 0,37. Para el *Apa I*, los resultados obtenidos fueron para el alelo "A" de 0,6 y para el "a" de 0,4. En cuanto a *Taq I*, los alelos "T" y "t" resultaron 0,63 y 0,37, respectivamente. Las frecuencias genotípicas para cada polimorfismo en el total de muestras analizadas se muestran en la Tabla I. La población se encontró en equilibrio genético de Hardy Weinberg para *Bsm I* y *Taq I* ($X^2_{(1)}$: 0,53 y 3,09; $p > 0,05$; NS). El valor de Ji cuadrado para el polimorfismo *Apa I* fue de 3,9; $p > 0,05$.

Las distribuciones genotípicas obtenidas para cada uno de los polimorfismos analizados, en los grupos control y estudio, se muestra en las Tablas II, III y IV.

Se encontró asociación significativa de los genotipos BB, AA y tt y el grupo con osteoporosis. ($X^2(2)$: 19,42; $p < 0,01$, 8,85; $p < 0,01$ y 6,54; $p < 0,05$)

Con respecto al cálculo de la RD, se obtuvieron valores significativos de riesgo para BB, AA y tt; teniendo las mujeres con estos genotipos un valor de 4,83, 2,52 y

2,88 veces más riesgo a desarrollar la OP que las mujeres con un genotipo distinto. Los genotipos de protección para la enfermedad resultaron Bb, aa y TT con valores de RD de 0,33, 0,38 y 0,48.

TABLA I
DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA
EN LA POBLACIÓN TOTAL ANALIZADA

Polimorfismos	Frecuencia genotípica (%)
Bsm I:	
BB	38,09
Bb	48,98
bb	12,93
Apa I:	
AA	39,45
Aa	40,14
aa	20,41
Taq I:	
TT	42,86
Tt	39,45
tt	17,69

Genotipos: BB, Bb, bb, AA, Aa, aa, TT, Tt, tt.

Estos resultados fueron corroborados cuando se analizaron los haplotipos resultantes, su asociación con los grupos estudiados fue altamente significativa con un valor de $X^2_{(7)}$: 20,57; $p < 0,01$, encontrándose el haplotipo BBAAtt en un 23,94% en el grupo con osteoporosis y un 5,26% en el grupo control. Se obtuvieron dos haplotipos con valores de RD significativos, BBAAtt (Haplotipo de riesgo) y BbaaTT (Haplotipo de protección), con valores de 5,66 y 0,10, respectivamente.

DISCUSIÓN

La investigación actual demostró asociación estadísticamente significativa de los genotipos individuales BB, AA y tt con la osteoporosis, con RD significativas que los califican como factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. De la misma manera, se determinó que el haplotipo BBAAtt estuvo presente en el grupo con OP en un 23,94%, mientras que en el grupo control

TABLA II
DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO *BSM I* DEL GEN DEL RECEPTOR
DE LA VITAMINA D

Grupos estudiados	BB		Bb		bb	
	#	%	#	%	#	%
Control	16	21,05	47	61,84	13	17,11
OP	40*	56,33	25	35,21	6	8,46

* $p < 0,01$ (Significativo). OP: osteoporosis. BB: genotipo homocigoto para ausencia de corte con la enzima BsmI. Bb: genotipo heterocigoto. bb: genotipo homocigoto para presencia de corte con la enzima BsmI.

TABLA III
DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO *Apa I* DEL GEN DEL RECEPTOR
DE LA VITAMINA D

Grupos estudiados	AA		Aa		aa	
	#	%	#	%	#	%
Control	22	28,95	33	43,42	21	27,63
OP	36*	50,70	26	36,62	9	12,68

* $p < 0,01$ (Significativo). OP: osteoporosis. BB: genotipo homocigoto para ausencia de corte con la enzima Apa I. Aa: genotipo heterocigoto. aa: genotipo homocigoto para presencia de corte con la enzima Apa I.

TABLA IV
DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO *Taq I* DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D

Grupos estudiados	TT		Tt		tt	
	#	%	#	%	#	%
Control	39	51,32	29	38,16	8	10,53
OP	24*	33,80	29	40,85	18*	25,35

* $p < 0,01$ (Significativo). OP: osteoporosis. TT: genotipo homocigoto para ausencia de corte con la enzima *Taq I*. Tt: genotipo heterocigoto. tt: genotipo homocigoto para presencia de corte con la enzima *Taq I*.

sólo se presentó en un 5,26%, obteniéndose valores de RD de riesgo para este haplotipo altamente significativo.

Estos hallazgos coinciden con Morrison y col. (9, 10) quienes reportaron que los individuos BB para el polimorfismo *Bsm I* poseían menor masa ósea que los individuos bb, y junto con los individuos AA presentaban valores de osteocalcina significativamente mayores que los presentados por los del grupo bb y aa, concluyendo que los genotipos del gen del RVD están altamente correlacionados con los niveles de osteocalcina.

Los resultados obtenidos también apoyan lo reportado por Borjas y col. (17) un estudio preliminar realizado en el año 2001 en el estado Zulia en mujeres posmenopáusicas en las que se analizó el polimorfismo *Bsm I* del gen del RVD, el genotipo BB estuvo presente en el grupo con osteoporosis en un 52% mientras que en el grupo control sólo apareció en un 20%, obteniéndose una asociación significativa entre el genotipo BB y la osteoporosis ($X^2_{(2)}$: 12,21, $p < 0,01$).

Resultados similares a este trabajo fueron también obtenidos por Gennari y col. (18) quienes reportaron un incremento significativo en la DMO en mujeres con genotipo bb y TT con respecto a las que poseían el genotipo BB y tt en mujeres italianas posmenopáusicas, además de reportar que las mujeres con el haplotipo BBAtt mostraron menor DMO y prevalencia estadísticamente significativa de osteoporosis.

Adicionalmente estudios realizados en el continente europeo y asiático con respecto al polimorfismo *Bsm I* reportan que las mujeres con genotipo BB presentan baja DMO en relación a las que poseen genotipo bb (19,20). Igualmente, se ha reportado que adolescentes con genotipos aa y bb presentan mayor masa ósea femoral y vertebral en comparación con las de genotipo AA y BB, al igual que DMO más baja en adolescentes con genotipo tt (15, 21, 22).

Ojwang y col. (23) en su estudio con mujeres surafricanas apoya la relación de los polimorfismos del gen del RVD con la OP, en tal análisis no se encontró diferencias entre los genotipos para el polimorfismo *Taq I* entre blancos e indios, a diferencias de los negros que tuvieron una frecuencia elevada significativa para el genotipo TT, por lo que se reportó que la alta frecuencia del genotipo TT en esa población, genotipo de protección en nuestro estudio, puede estar relacionada con la baja incidencia de la osteoporosis en este grupo poblacional que se conoce forma más masa ósea que los otros grupos étnicos.

Respecto a las teorías que explican la relación entre los polimorfismos del gen del RVD y la DMO y en consecuencia la OP, en primer lugar tenemos la hipótesis presentada por Morrison y col. la cual establece que los alelos del gen del RVD son funcionalmente diferentes y contribuyen a la variabilidad fisiológica de los niveles de osteocalcina, la proteína no colágena más abundante

del hueso, y un marcador específico de recambio óseo. La osteocalcina es inducida por el calcitriol a través del receptor de la vitamina D. La diferencia funcional de los alelos se expresa en el grado en que el gen de la osteocalcina es inducido a través de la activación transcripcional del RVD. Se planteó también que la influencia genética sobre la masa ósea se relaciona con la aceleración de los procesos de remodelado óseo, demostrando que las mujeres con genotipo BB tenían menos masa ósea lumbar que las de genotipo bb y presentaban mayor aceleración del proceso de resorción ósea, mayor rompimiento del colágeno tipo I y valores aumentados de calcitriol y fosfato, lo que producía a la larga pérdida acelerada del esqueleto mineral y DMO baja (6, 9, 24, 25).

Otra teoría que se maneja para explicar la asociación de los polimorfismos del gen del RVD y la OP, tiene que ver con la ingesta de calcio. En efecto, los factores ambientales como la ingesta de calcio son conocidos por diferir ampliamente entre las poblaciones. Esta teoría se apoya en un estudio realizado en dos grupos de mujeres identificadas por tener genotipos BB y bb sometidas a periodos con alta y baja ingesta de calcio. En los estadios con alta ingesta de calcio ambos grupos presentaron un índice de absorción fraccional de calcio similar, pero durante el periodo de restricción de calcio, las mujeres con genotipo BB incrementaron la absorción en porcentaje significativamente menor que las mujeres con genotipo bb, lo que demuestra que las mujeres con genotipo BB absorben el calcio menos eficientemente que las de genotipo bb. Se postuló que las homocigotas BB podrían tener menos eficiencia en el transporte activo del calcio, debido a que su defecto se expresa en periodos de baja ingesta de calcio cuando el transporte activo es aumentado por los niveles altos circulantes del calcitriol, a diferencia de los

periodos de alta ingesta de calcio, en el cual la absorción por el calcitriol es independiente de la difusión pasiva la cual juega un rol importante (26).

Estudios semejantes apoyan las teorías mencionadas anteriormente e indican que la variación de la DMO y el riesgo de sufrir osteoporosis están influenciados por las interacciones entre el gen del RVD y otros genes, así como también por factores ambientales, tales como la historia ginecológica y reproductiva, la dieta, los hábitos de vida, el ejercicio y la exposición a drogas (6, 27-31).

Es importante destacar que existen otros estudios que reportan la no asociación de los polimorfismos del gen del RVD con la DMO (32-42). Tales discrepancias son el reflejo de la complejidad intrínseca del remodelado óseo y han sido explicadas por los factores ya señalados: diferencia étnica de las poblaciones estudiadas, heterogeneidad ambiental relacionada con la ingesta de calcio y calcitriol, limitaciones en cuanto al tamaño de la muestra analizada, interacciones de otros genes con el gen del RVD y del gen del RVD con el ambiente, ligamiento de este gen con otros genes aún no identificados o a un cambio en la regulación o función del propio RVD (26, 27, 38, 43).

Aún considerando estas discrepancias, en nuestro caso, los resultados encontrados en la población del Estado Zulia sugieren asociación significativa entre los genotipos BB, AA y tt y la OP, por lo que se recomienda incluir dentro del protocolo diagnóstico el análisis haplotípico de los polimorfismos del gen del RVD como marcadores genéticos para desarrollar la Osteoporosis, indicar el estudio a temprana edad a las descendientes de estas mujeres con predisposición, y así constituirse en una herramienta útil en la identificación de grupos de elevado riesgo, que permita la toma de acciones a tiempo para la prevención de la enfermedad.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento de la presente investigación, proyecto # AA 1177-00. A los Drs. Argelia Ocando y Freddy Alaña por la referencia de las pacientes.

REFERENCIAS

1. **Brown J, Fortier M.** Canadian Consensus Conference on Osteoporosis, 2006 Update. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28:S95-S112.
2. **Hermoso-Mendoza MT.** Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and diferencial diagnosis. *An Sist Sanit Navar.* 2003; 26:29-52.
3. **Hobecker O, Ariel V, Mango N, Giménez S.** Impacto de la osteoporosis en la población. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* 2005; 144:24-27.
4. **Lane NE.** Epidemiology, etiología, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:S3-S11.
5. **Fang Y, Rivadeneira F, Van Meurs JB, Pols HA, Ioannidis JP, Uitterlinden AG.** Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 2006; 39: 938-945.
6. **Jordan K, Cooper C.** Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002; 16:795-806.
7. **Giguere Y, Rousseau F.** The genetics of osteoporosis: complexities and difficulties. *Clin Genet* 2000; 57:161-169.
8. **Macdonald HM, McGuigan FE, Stewart A, Black AJ, Fraser WD, Ralston S, Reid DM.** Large-scale population-based study shows no evidence of association between common polymorphism of the VDR gene and BMD in British women. *J Bone Miner Res* 2006; 21:151-162.
9. **Morrison N, Yeoman R, Kelly P, Eisman J.** Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6665-6669.
10. **Morrison N, Cheng J, Aklfum T, Kelly P, Crofts L, Nguyen T, Sambrook P, Eisman J.** Prediction of bone density from vitamin d receptor alleles. *Nature* 1994; 367:284-287.
11. **Rizzoli R, Bonjour J, Ferrari S.** Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol* 2001; 26:79-94.
12. **World Health Organization.** Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO. Technical Report Series 1994. Ginebra. Suiza.
13. **Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J.** Preparation of genomic DNA. Phenol extraction and concentration of DNA from aqueous solutions. In: *Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology.* Ed. 1989. Reene Publishing associates and Willey-Interscience.
14. **Miller A, Dykes D, Polesky H.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16:12-15.
15. **Sainz J, Jan M, Van Tornout, Loro ML, Sayre J, Thomas F, Roe TF, Gilsanz V.** Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *N Engl J Med* 1997; 337:77-82.
16. **Corzo G.** Epidemiología Ocupacional. Editorial Ediluz. Primera edición. 1999.
17. **Borjas L, Zambrano M, Fernández E, Pineda L, Machín A, Romero P, Zabala W, Sánchez MA, Chacín JA, Delgado W.** Análisis del Polimorfismo *Bsm I* del Gen Receptor de la Vitamina D en Pacientes con Osteoporosis del estado Zulia. *Invest Clin.* 2003; 44:275-282.
18. **Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli, Cepollaro C, Martini S, Montagnan A, Lentini G, Becorpi AM, Brandi ML.** Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:939-944.

19. **Bernard M, Jaramillo G, Aguado P, Del Campo T, Coya J, Martin Mola E, Gijon B, Saldana B, Martínez ME.** Polymorphism of the gene of vitamin D receptor and bone mineral density in postmenopausal women. *Med Clin (Barc)* 1999; 112: 651-655.
20. **Kikuchi R, Vemura T, Gorai C, Ohnos S, Minaguchi H.** Early and late postmenopausal bone to associate with Bsm I vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int* 1999; 64:102-106.
21. **Tao C, Yu T, Garnett S, Briody J, Knight J, Woodhead H, Cowel CT.** Vitamin D receptor alleles predict growth and bone density in girls. *Arch Dis Child* 1998; 79:488-494.
22. **Fang Y, Van Meurs JB, Rivadeneira F, Van Leeuwen JP, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG.** Vitamin D receptor gene haplotype is associated with body height and bone size. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 10:1-41.
23. **Ojwang P, Pegoraro R, Rom L, Lanning P.** Collagen I alpha 1 and vitamin d receptor gene polymorphisms in south african whites, blacks and Indians. *East Afr Med J* 2001; 78:604-607.
24. **Kelly P, Hopper J, Macaskill G, Pocock N, Sambrook P, Eisman J.** Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:808-813.
25. **Howard G, Nguyen T, Morrison N, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, Kelly PJ.** Genetic Influences on bone density: Physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2800-2805.
26. **Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S.** Calcium Absorption on High and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3657-3661.
27. **Eisman J.** Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 1999; 20: 788-804.
28. **Raltons SH.** Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17:475-479.
29. **Quareshi A, Ralston S.** The genetics of Osteoporosis. *J Br Meno Soc* 1999; 5:7-10.
30. **Raisz L.** Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3318-3325.
31. **Zintzaras E, Rodopoulou P, Koukoulis GN.** BsmI, Apal and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: A meta-analysis. *Dis Markers* 2006; 22:317-326.
32. **Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J.** Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994; 94: 2130-2134.
33. **Jorgensen HL, Scholler J, Sand JC, Bjuring M, Hassager C, Christiansen C.** Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone loss: cross sectional and longitudinal population study. *J Metab Bone* 1996; 313:586-590.
34. **Peacock M.** Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: A contrasting view. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1294-1297.
35. **Lim SK, Park YS, Park JM, Song YD, Lee EJ, Kim KR, Lee HC, Huh KB.** Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3677-3681.
36. **Vandevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, Raus J, Geusens P.** Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 1997; 12:241-247.
37. **Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Arlot M, Delmas PD.** Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1283-1288.
38. **Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Monique E, Delmas P.** Vitamin D receptor gene polymorphism are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: The OFELY Study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 827-834.

39. Ramalho A, Lazareti M, Havache O, Kasamatsu T, Brandao C, Reis AF, Cafalli F, Tavares F, GimenoSG, Vieira JG. Fractures of the proximal femur: correlation with vitamina D receptor gene polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:921-927.
40. Sosa Henriquez M, Torres A, Domínguez C, Salido E, Saavedra S, Santana P, Barrios Y, Liminana JM, Betancor P. Genetic polymorphism of vitamin D receptor and osteoporosis. *Med Clin* 1998; 110: 646-650.
41. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amedei A, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Mavilia C, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP; APOSS Investigators; EPOS Investigators; EPOLOS Investigators; FAMOS Investigators; LASA Investigators; Rotterdam Study Investigators; GENOMOS Study. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006; 15:255-264.
42. Fang Y, Van Meurs JB, Rivadeneira F, Pols HA, Ioannidis JP, Uitterlinden AG. Vitamin D receptor gene Bsm I and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 2006; 39: 938-945.
43. Eisman J. Vitamin D receptor alleles and osteoporosis: An affirmative view. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1289-1293.