

Evolución de la masa ósea tras el trasplante. Factores relacionados, influencia del gen del receptor de la Vitamina D y utilidad de la DEXA en su valoración

J. V. Torregrosa, F. Pons, F. Martín, M. J. Martínez de Osaba, J. M. Campistol, F. Oppenheimer, A. Torres

Resumen

En este estudio evaluamos, prospectivamente, la evolución a largo plazo de la masa ósea (BMD) post trasplante renal y los factores, clínicos o bioquímicos, que pueden influir en su evolución, incluido el papel del genotipo del receptor de la vitamina D (VDR), así como la utilidad de la absorciometría radiológica de doble energía (DEXA) en su seguimiento.

Estudiamos 102 receptores de injerto renal (TR), 61 hombres y 41 mujeres, de edad media de 45 ± 14 años, con un tiempo medio en hemodiálisis de 57 ± 43 meses. El tratamiento inmunosupresor fue: Ciclosporina en monoterapia en 19 y Ciclosporina más Prednisona en 83 (en estos últimos como tratamiento de inducción o de rechazo). 22 presentaban Hiperparatiroidismo secundario moderado-severo (HPT) ($PTHi > 250$ pg/ml) en el momento del TR. Durante el período de estudio ningún paciente fue paratiroidectomizado, ni recibió drogas que pudieran modificar el metabolismo óseo. Se realizaron basalmente y a los 6, 12 y 24 meses determinaciones de PTHi, Ca, P, Fosfatasas alcalinas, Calcitriol, Aluminio, Creatinina, CyA, resto parámetros bioquímicos habituales y DEXA de columna lumbar y cuello femoral. Se determinó en todos los pacientes los polimorfismos del alelo del gen del VDR por medio de PCR. Los resultados se analizaron mediante estadística convencional.

Todos los pacientes incluidos en este estudio mantuvieron función renal normal. 41 pacientes presentaron el genotipo del VDR favorable bb, 46 el bB y 14 el desfavorable BB. Los pacientes pertenecientes a los diferentes grupos genotípicos eran similares en cuanto a edad, sexo y tiempo en HD. La BMD disminuyó significativamente a los 6 meses ($p < 0.01$) y posteriormente se recuperó parcialmente. En los pacientes que presentaban HPT en el momento del TR, los niveles de PTHi persistieron elevados a lo largo de todo el estudio. No hubo diferencias significativas en la pérdida de BMD entre los tres grupos genotípicos. Solo el tratamiento esteroideo ($p < 0.01$) y el HPT ($p < 0.05$) tuvieron incidencia significativa en la pérdida de BMD. No hubo diferencias significativas respecto a los demás parámetros.

En conclusión, tras el TR se produce una rápida disminución de DMO, claramente relacionada con el tratamiento esteroideo y el HPT, que posteriormente tiende a recuperarse parcialmente. El HPT persiste en el tiempo. La influencia del genotipo del VDR sobre la DMO es mínima, especialmente ante la presencia de HPT o tratamiento esteroideo. La DEXA es de gran utilidad en el seguimiento de estos pacientes.

Hospital Clinic, Barcelona
Hospital Universitario, Tenerife

PALABRAS CLAVE: Trasplante renal, masa ósea, vitamina D.

Evolution of bone mass after renal transplantation.
Risk factors, influence of Vitamin-D receptor (VDR) genotype
and usefulness of DEXA in the follow-up

In the present study, we evaluated prospectively the long-term evolution of bone mineral density (BMD) after kidney transplantation (KT) and correlated it with several clinical and biochemical parameters including the influence of VDR genotype.

102 renal transplant recipients (61 male, 41 female) have been studied. Mean age = 45 ± 14 years. All recipients were on HD before KT with a mean time of 57 ± 43 months. Immunosuppression therapy: CyA monotherapy in 19 and CyA+Prednisone in 83. 22 patients had a moderate-severe hyperparathyroidism ($PTHi > 250$ pg/ml) before surgery. During the follow-up period none were parathyroidectomized nor received drugs that could modify bone metabolism, such as calcium, diphosphonates or calcitriol. Blood samples for PTHi, Ca, P, Alkaline phosphatase, Calcitriol, Creatinine, Cyclosporin and Aluminum were obtained before KT and at 6, 12, and 24 months. Simultaneously, dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) of the lumbar spine and femoral neck were performed. In all patients VDR-gene allelic polymorphisms were typed by using a PCR-based assay. Conventional statistical analyses were performed.

All patients had normal renal function during all study period. In the whole group, BMD decreased significantly at 6 months ($p < 0.01$) and then progressively recovered. In patients with high PTHi blood levels at the moment of KT, the high PTHi levels persisted during the study period. 41 patients had the VDR favourable genotype bb, 46 had the Bb and 14 had the non-favourable BB. The three genotype groups were similar in terms of age and time on HD. Only the steroid therapy ($p < 0.01$) and severe secondary hyperparathyroidism ($p < 0.05$) had significant influence in the loss of BMD after KT and there were no significant differences between three different genotype groups in the loss of BMD.

In summary, after KT there are an acute loss of BMD that later is recovering partially. The loss of bone mass is clearly correlated with steroid therapy and HPT. PTHi levels remained unchanged and severe HPT persist. The VDR genotype have minimal influence on the prediction of evolution of BMD, specially in the presence of HPT and/or steroid therapy. DEXA of the lumbar spine have an high sensitivity in the follow-up of the bone mass evolution.

KEY WORDS: Kidney transplant, bone mass, vitamin D.

Introducción

La mayor supervivencia alcanzada actualmente por los receptores de un injerto renal condiciona que se manifiesten en ellos diferentes alteraciones que pueden modificar sensiblemente la calidad de vida del paciente, entre ellas, es de destacar la patología ósea metabólica, de origen multifactorial, presente antes del trasplante y que puede agravarse con el mismo (1).

Las alteraciones del metabolismo mineral óseo, la denominada "Osteodistrofia renal", se presenta de manera precoz en los pacientes afectados de Insuficiencia Renal Crónica.

El término "Osteodistrofia renal" se utiliza en sentido genérico para referirse a todas las variedades de enfermedad ósea que aparecen como consecuencia de la Insuficiencia Renal Crónica, aunque ninguna de ellas es específica de la misma y son consecuencia de alteraciones de la función paratiroidea y del metabolismo óseo-mineral (2).

El descenso progresivo del filtrado glomerular produce retención de fosfatos, y una reducción en la síntesis de 1.25-dihidroxivitamina D ($1.25(0H)_2D_3$ o Calcitriol) por la pérdida de masa renal funcionante, lo que a través de diferentes mecanismos provocará un aumento en la secreción de hormona paratiroidea (PTH), máxima responsable de la afectación ósea (3, 4).

La Osteodistrofia renal afecta a prácticamente la totalidad de los pacientes en diálisis (5) y básicamente puede manifestarse de tres formas:

1) Enfermedad ósea de alto remodelado (aumento de la formación y resorción óseas), que es provocada por la elevación de los niveles plasmáticos de hormona paratiroidea (PTH) y se caracteriza por un incremento de la actividad celular (osteoclastos, osteoblastos y fibrosis peritrabecular) junto a una tasa de mineralización normal o elevada. En estadios iniciales se denomina "forma leve", y si la hiperfunción paratiroidea progresa da lugar a la *Osteitis fibrosa* (6).

En la enfermedad ósea de alto remodelado, el factor más importante identificado como causa del incremento de la formación ósea es el alto nivel circulante de PTH (Hiperparatiroidismo secundario) cuyo estímulo principal es la hipocalcemia (7). Las principales causas que contribuyen al mantenimiento de la hipocalcemia y desarrollo del hiperparatiroidismo secundario incluyen: a) retención de fósforo, que induce un descenso en las concentraciones de calcio iónico, b) disminución en la síntesis de Calcitriol, con lo que disminuirá la absorción intestinal del calcio, c) alteraciones en la regulación PTH-calcio, en la Insuficiencia renal crónica se requieren mayores concentraciones de PTH para producir una elevación de la calcemia (resistencia esquelética a la acción de la PTH), d) degradación reducida de la PTH secundaria al deterioro de función renal, e) alteraciones en el set-point de calcio, lo que viene a decir que se requieren cifras más elevadas de calcio para frenar la hiperproduc-

ción de PTH (8, 9).

2) Enfermedad ósea de bajo remodelado, se caracteriza por un defecto de mineralización y una actividad celular deprimida. Cuando coexiste un marcado incremento del grosor osteoide nos encontramos ante el cuadro típico de Osteomalacia, mientras que si la hiperosteoiditis es discreta nos encontraremos ante una *Enfermedad ósea aplásica o adinámica* manifestada por un descenso en la formación ósea y en la actividad celular, sin un incremento marcado en el grosor del osteoide (10).

Los factores que pueden provocar una enfermedad ósea de bajo remodelado, al dificultar la formación ósea, su mineralización y reducir el remodelado óseo incluyen básicamente la intoxicación aluminica y el hipoparatiroidismo relativo (11-13).

c) Enfermedad ósea mixta, que se caracteriza por la coexistencia de signos de osteitis fibrosa y osteomalacia, observándose un marcado incremento de la actividad celular, asociado a un marcado exceso de osteoide similar al observado en pacientes con osteomalacia. La tasa de mineralización es variable, pudiendo encontrarse normal, baja o elevada.

Todas estas lesiones se pueden encontrar con una masa ósea normal, aunque lo habitual es que nos encontremos con una masa ósea disminuida (*Osteoporosis*). El término Osteoporosis hace referencia a la "pérdida o disminución de la masa, estructura y función de los huesos que se asocia a fracturas". Cuando sólo se aprecia una pérdida de masa ósea sin fracturas asociadas se habla de Osteopenia. Clásicamente, la osteoporosis suele aparecer en pacientes de edad avanzada y en los que siguen tratamiento con esteroides.

En la década de los 80, estudios con absorciometría monofotónica (SPA) en radio distal de pacientes con osteodistrofia renal demostraron una menor densidad mineral con respecto a la población normal y una progresiva pérdida de masa ósea en relación con la duración de la diálisis (14).

Tras el trasplante renal, se ha podido observar una persistente pérdida de masa ósea (15), a pesar de que se corrigen los mecanismos que conducen a la osteodistrofia renal: se normaliza el filtrado glomerular, se corrige la retención de fósforo y se restablece la síntesis de Calcitriol.

Esta pérdida de masa ósea se atribuyó en un principio al tratamiento inmunosupresor con esteroides (16). Es bien conocido que el tratamiento prolongado con glucocorticoides produce osteoporosis que afecta más al hueso trabecular que al hueso cortical (17). Una dosis mínima de prednisona produce una pérdida significativa de hueso trabecular, siendo esta pérdida mayor durante las primeras semanas de tratamiento. Se ha descrito una pérdida de hueso trabecular a dosis tan bajas como 7.5 mgrs/día. Patogenéticamente se ha postulado que esta pérdida obedece a que, de forma indirecta, disminuyen la producción gonadal y suprarrenal de esteroides sexuales, disminuyen la absorción intestinal de calcio, alteran el

metabolismo de la vitamina D, alteran la excreción renal de calcio y fosfatos y actúan de forma directa sobre el hueso estimulando la resorción e inhibiendo la formación ósea (18, 20).

La introducción de la Ciclosporina A permitió disminuir significativamente la dosis de esteroides, habiéndose observado una reducción en la incidencia de necrosis óseas avasculares, sin embargo, la osteopenia sigue siendo un problema importante en los enfermos trasplantados. Los efectos que, en trasplantados renales ejerce la Ciclosporina A sobre el hueso son contradictorios, y así, mientras unos autores han encontrado datos histológicos de recambio óseo aumentado, otros autores encuentran un recambio disminuido. In vitro se ha observado que la Ciclosporina A tiene un efecto protector sobre el hueso, ya que inhibe la resorción ósea inducida por la PTH, calcitriol, factor activador de osteoclastos, IL-1 y PGE-2. Sin embargo, in vivo, en ratas tratadas con Ciclosporina A hay una pérdida importante de hueso trabecular con un recambio óseo acelerado, como lo demuestra el aumento de osteocalcina y del número de células de aspecto osteoclástico (21).

Con los datos actuales, se sabe que las alteraciones del metabolismo mineral óseo persisten tras el trasplante renal, pero existe escasa información sobre qué factores y en qué medida influyen en su evolución, puesto que los pocos estudios realizados lo han hecho sobre poblaciones altamente seleccionadas. No se conoce con certeza el efecto que sobre el hueso ejerce el tratamiento inmunosupresor ya que, habitualmente, los pacientes sometidos a trasplante reciben, simultáneamente, varias drogas inmunosupresoras, que pueden tener efectos contrapuestos sobre el contenido mineral óseo como ocurre con los esteroides y la Ciclosporina A. Tampoco parece quedar claro qué ocurre con el hiperparatiroidismo secundario y cuál es la repercusión que su persistencia podría tener sobre el metabolismo óseo de estos pacientes, así como la de otros parámetros clínicos.

Por otro lado, es esencial una correcta monitorización de la evolución de la masa ósea tras el trasplante renal para lograr un adecuado control, prevención y tratamiento.

La biopsia ósea (histomorfometría) constituye la técnica estándar determinante, pero es una técnica agresiva y molesta para el paciente como para ser practicada de manera seriada.

El radiodiagnóstico convencional no detecta pérdidas de masa ósea inferiores al 30% y por ello, hoy en día, no se emplea para el reconocimiento ni monitorización de la osteodistrofia, sino exclusivamente para detectar las complicaciones asociadas.

En los últimos años se han desarrollado técnicas no invasivas para la determinación cuantitativa de la densidad de sales minerales del hueso debido en gran parte a la preocupación creciente por la osteoporosis, de forma que sea posible su detección precoz, la monitorización de su progresión y la respuesta al tratamiento (22-25). Se ha re-

currido a numerosos métodos con grados variables de precisión (reproducibilidad longitudinal en estudios seriados), exactitud (el valor obtenido refleje el verdadero contenido mineral) y sensibilidad (capacidad para establecer fácilmente una diferenciación entre población normal y anormal, o para detectar con rapidez aquellas alteraciones que se producen con el tiempo en un paciente o en una población). En la actualidad se puede medir con un alto grado de precisión y exactitud el sistema óseo total o regional así como su porción trabecular y cortical (26).

El lugar preferente para la medición cuantitativa de la densidad mineral ósea (DMO) es la columna lumbar. Se trata de una zona central, de sobrecarga del peso orgánico, que presenta una gran cantidad de hueso trabecular (33-50%). Debido a la alta proporción superficie-volumen, el recambio óseo del hueso trabecular es unas 8 veces superior a la del hueso compacto (27, 28). Este elevado índice de remodelado en el hueso trabecular le convierte en una zona de primera importancia para la detección de pérdidas de masa ósea, así como para la monitorización de la respuesta a diversas intervenciones.

Es por ello que los métodos de medida que se basan en los análisis de la columna lumbar son los más empleados, aunque también puede ser importante medir el cuello femoral (región intertrocanterea y el triángulo de Ward) por su riqueza en hueso cortical con lo que se podrán establecer relaciones. Los métodos más importantes en su utilización clínica son, la absorciometría monofotónica (SPA), la absorciometría fotónica dual (DPA), recientemente la absorciometría radiológica de doble energía (DEXA) (29) y en menor medida la tomografía computarizada cuantitativa (TCC) de simple o doble energía. Otras técnicas como la radiogrametría, la activación neutrónica o el índice de dispersión de Compton no se utilizan en la práctica clínica habitual.

La absorciometría del esqueleto central se hizo posible con la introducción de los métodos biespectrales. Estos métodos se basan en la obtención de datos de un mismo punto de medida con dos niveles de energía fotónica. La masa mineral a lo largo de la radiación de medida se calcula a partir de la altura y de la diferencia de ambos parámetros, de esta manera, prácticamente se elimina el efecto de las partes blandas superpuestas o incluidas en la cortical, aunque todavía se mantiene un error residual debido al tejido graso, que se diferencia, por sus propiedades de atenuación, del resto de los tejidos blandos. El contenido mineral se expresa en g/cm^2 y los valores indican el contenido mineral óseo total, incluyendo hueso compacto y trabecular. Las estructuras calcificadas superpuestas tipo osteofitos, calcificaciones vasculares, etc. pueden determinar unas medidas falsamente elevadas.

La *absorciometría radiológica de doble energía (DEXA)* (30, 31) es un procedimiento absorciométrico que utiliza una fuente de rayos X de doble energía para representar y medir el contenido óseo mineral de algunos segmentos óseos (fundamentalmente columna vertebral y cuello femoral) o del esqueleto conjunto. Utiliza un tubo

ción espacial (1.5 mm) con una mínima duración de la exploración (5 min.).

La utilización de una fuente de rayos X ha mejorado la reproductibilidad del método a cifras de una magnitud del 1-2%.

Pueden aparecer errores sistemáticos que suelen obedecer a superposición de estructuras, de ahí que se practique una Rx simple previa a la exploración para detectar calcificaciones en áreas blandas que puedan alterar los resultados.

La dosis superficial en un estudio DEXA se estima en un rango entre 10-30 μ Sv, con una dosis efectiva equivalente de 1 μ Sv (0.04% de la sobrecarga radiactiva natural anual).

Hoy en día, y a medida que han ido mejorando los resultados del trasplante renal a corto plazo, empiezan a preocupar seriamente los problemas a largo plazo. Así, si ya la osteoporosis post-menopáusica e involucional son un problema sanitario de primera magnitud, la inducción de pérdidas adicionales tras el trasplante multiplica el problema en esta población.

Los factores genéticos, junto con un gran número de factores ambientales, son determinantes importantes de la masa ósea. De entre los factores genéticos, se ha atribuido un gran papel al gen del receptor de la vitamina D (VDR), para el que se han descrito dos alelos comunes (B y b) basándose en un lugar BsmI polimórfico (ausente en B y presente en b).

En individuos normales, se pueden emplear las variantes alélicas comunes del gen del VDR para predecir diferencias en la masa y turnover óseos (32, 33). Por otro lado, en tres estudios longitudinales publicados recientemente, también se pudo predecir, mediante la determinación del genotipo del VDR, la pérdida de masa ósea en mujeres sanas (34, 35) e individuos de edad avanzada (36).

Sin embargo, la influencia genética sobre la evolución de la masa ósea post trasplante renal todavía no ha sido evaluada. Nosotros desarrollamos una PCR-RFLP para determinar los alelos del gen del VDR, y poder investigar, en base al genotipo del paciente, la posible predicción de los cambios de la masa ósea post trasplante renal.

En resumen, aunque actualmente es conocido que las alteraciones del metabolismo mineral óseo de los pacientes afectados de Insuficiencia Renal Crónica no se controlan completamente tras el trasplante renal (1, 37), son pocos los datos respecto a la evolución de la masa ósea post-trasplante renal y los factores (tanto pre como post trasplante) que puedan modificar su evolución.

En el presente estudio evaluamos, prospectivamente, la evolución de la masa ósea tras el trasplante renal y los factores, tanto clínicos como bioquímicos, que pueden influir en su evolución; el papel del genotipo del receptor de la vitamina D en su predicción; así como la utilidad de la DEXA en su seguimiento.

Material y métodos

Pacientes

Se incluyeron en el estudio 102 pacientes, no seleccionados, excluyéndose únicamente los afectados de Diabetes Mellitus, afectados de Insuficiencia renal crónica en programa de Hemodiálisis Periódica, a los que se realizó Trasplante renal con injerto procedente de cadáver.

Se trataba de 41 mujeres y 61 hombres, con una edad media de 45 ± 14 años y un tiempo en Hemodiálisis pre-trasplante de 57 ± 43 meses. De ellos 88 recibían su primer injerto renal y 14 su segundo (retrasplantados). La enfermedad renal primaria era en 33 casos una glomerulonefritis crónica, en 27 nefritis túbulo-intersticial, 10 poliquistosis renal del adulto, 12 nefroangiosclerosis, y 20 de etiología no filiada.

Veintidós pacientes (21.5 %) presentaban un Hiperparatiroidismo secundario moderado-severo en el momento del trasplante y no había ningún paciente paratiroidectomizado.

Como tratamiento inmunosupresor 19 de los pacientes (18.6%) se mantuvieron con Ciclosporina A en monoterapia y 83 recibieron Ciclosporina más Prednisona (81.4%), de los cuales 32 recibieron altas dosis de Prednisona (de ellos también 19 recibieron OKT3 o Suero antilinfocitario) como tratamiento de rechazo agudo.

La dosis inicial de Ciclosporina fue de 10 mgrs/Kg, de peso/día, reducida gradualmente según los niveles sanguíneos de Ciclosporinemia, con objeto de mantener niveles de entre 150-250 ng/ml, RIA específico. La dosis de Prednisona fue de 1 mgr/Kg, de peso/día durante los tres primeros días post-trasplante con posterior reducción gradual hasta dosis de 0.15-0.25 mgrs/Kg, de peso/día a los 6 meses. En los casos de Rechazo agudo se administraron 0.5 grs. de Prednisona/24 horas durante 3 días con reducción rápida hasta alcanzar las dosis previas.

Ninguno de los pacientes incluidos recibió durante el período de estudio otras drogas que pudiesen modificar el metabolismo óseo mineral tales como calcitonina, difosfonatos, calcitriol, suplementos de calcio o terapéutica hormonal.

Diseño del estudio

Inmediatamente antes del trasplante y a los 6, 12 y 24 meses posttrasplante se practicaron los siguientes estudios:

- Rx simple de columna lumbar
- DEXA de columna lumbar y cuello femoral

Pre trasplante y trimestralmente se realizaron las siguientes determinaciones analíticas sanguíneas:

PTHi, Calcio, Fósforo, Fosfatasa alcalina, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Aluminio Creatinina y Aclaramiento de creatinina y Ciclosporinemia.

También se consideraron las habituales determinaciones de bioquímica general incluyendo enzimas hepáticas y hemograma.

Retrospectivamente se determinó, en todos los casos, los alelos del gen del receptor de la vitamina D (VDR).

Determinaciones de laboratorio

Los niveles séricos de PTHi se determinaron mediante inmunoradiometría (IRMA, Nichols Institute, USA) con un rango de normalidad entre 12-65 pg/ml. Los niveles plasmáticos de $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mediante un radioreceptor tras purificación cromatográfica en columna de C_{18}OH (Nichols Institute, USA) con un rango de normalidad de entre 18-62 ng/ml. Los niveles séricos de Aluminio mediante espectrometría de absorción atómica electrotrémica, los de Ciclosporinemia mediante RIA monoclonal específico y los de Calcio, Fósforo, Fosfatasas alcalinas y Creatinina se determinaron mediante técnicas estándar con autoanalizador.

Medida de la densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea se determinó mediante un absorciómetro de rayos X de doble energía (DEXA) modelo LUNAR DPX-L.

Los scanners se realizaron a nivel de columna lumbar (L2, L3 y L4) y cuello femoral derecho. Los resultados se expresaron en gr/cm^2 y calculados al dividir el contenido mineral óseo de hidroxiapatita de cada región por el área ósea de proyección. Se realizó un control de calidad mediante calibración interna diaria con un fantoma específico suministrado por la casa manufacturadora y un test semanal mediante un fantoma aluminico similar a la columna lumbar. El coeficiente de variación "in vitro" de nuestro laboratorio fue de 0.5%, 0.8% en voluntarios normales y 1.3% en pacientes con osteoporosis.

Los valores de densidad mineral ósea se compararon con valores de referencia de voluntarios sanos de nuestra área geográfica y, así mismo, se corrigieron para edad y sexo, expresándose, como el número de desviaciones estándar (z-score) del valor normal que le correspondería al paciente según área geográfica, edad y sexo.

Determinación genómica de los alelos del VDR

Los alelos VDR fueron identificados mediante PCR, prueba desarrollada para averiguar la presencia de una restricción polimórfica BsmI situada en el séptimo intron del gen VDR. El DNA fue purificado a partir de 3 ml. de sangre siguiendo la siguiente pauta: digestión de la proteínasa K, extracción con fenocloroformo y precipitación en etanol (38). Para desarrollar una prueba basada en la PCR, clonamos y secuenciamos una porción del gen VDR donde ha sido descrito la existencia de un polimorfismo BsmI (32). De forma concisa, una porción de 0'6 kilobases del intron 7 fue amplificada con los primeros hVDR-1: 5'-CAACCAAGACTAACAAGTACCGCG-3' y con hVDR-2 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGG-3'. El producto del PCR se clonó en pCRII (In Vitro) y se secuenció con una DNA polimerasa modificada T7 (USB). Dentro de la porción ampliada del intron 7 se encontró un lugar de restricción BsmI (GAATGCG), y los

primeros seguimientos se idearon para amplificar un fragmento de 191 bp que incluía el punto de polimorfismo BsmI: hVDR-3: 5'-AGTGTGCAGGCGATTTCGTAG-3' y hVDR4: 5'-ATAGGCAGTTCCATCTCTCAG-3'. Aproximadamente 0'1 microgramos de DNA fueron amplificados con los primeros hVDR-3 and hVDR-4 en 50 microlitros mediante reacciones incluyendo 10mM Tris HCL, pH 9.0, 50 mM KCL, 1.5 mM Mg CL_2 , 0'1% Triton X-100, 0'1 mM dNTPs, 0'5 microM cada primer y 1 U DNA polimerasa Taq. Una cicladora Perkin-Elmer 480 fue empleada para conseguir más de 30 ciclos de amplificación, con el siguiente perfil de temperatura: 94°C (1 minuto), 62°C (1 minuto), 72°C (1 minuto). Diez microlitros del producto amplificado fueron digeridos con 5U BsmI (New England Biolabs) a 65°C durante tres horas en un volumen total de 20 microlitros, conteniendo 4 mM de espermidina, 10 mM Tris HCL, pH 7'9, 50 mM Na CL, 10 mM Mg CL_2 , 0'1 mM DTT. Los productos de la digestión fueron identificados mediante electroforesis en 5% de gel de poliacrilamida y después tiñéndolos con 0.5 microgramos/ml. de bromuro de etidio, el alelo VDR b fue observado como dos bandas de 115 y 76 bp, mientras el alelo B se identificó como una simple banda. Para validar nuestra prueba, inspeccionamos dos veces el VDR de los pacientes incluidos en este estudio por análisis de Southern, como describieron Morrison et al (32), empleando una sonda VDR humana obtenida desde el depósito ATCC.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t de Student para comparar diferencias de variables continuas. Chi cuadrado para proporciones, análisis de la varianza y test de Fisher con coeficiente de correlación de Pearson cuando se requirió, para las diferencias entre grupos y un análisis de regresión lineal para correlaciones. Como método multivariado se utilizó el análisis de regresión logística. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

La DMO media basal, expresada como porcentaje respecto de la población normal, fue de $100.6 \pm 16.2\%$ a nivel columna lumbar y de $96.4 \pm 18.2\%$ a nivel cuello femoral, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre la DMO media de la población sana y la de los pacientes en Hemodiálisis. Tampoco se observaron diferencias significativas entre DMO (tanto lumbar como femoral) y enfermedad renal primaria, tiempo en Hemodiálisis ni valores basales de Calcio, Fósforo o Calcio. La DMO lumbar se correlacionó inversamente con el grado de Hiperparatiroidismo ($p < 0.05$) y niveles de Fosfatasa alcalina ($p < 0.05$) basales.

La evolución de los parámetros bioquímicos tras el trasplante renal se expresa en la tabla I. Tanto a los 6 meses como a los 12 y 24 meses post-trasplante, los niveles sanguíneos de Creatinina, Calcio, Fósforo, Calcitriol, Aluminio y Ciclosporinemia se encuentran dentro

TABLA I
EVOLUCION DE PARAMETROS BIOQUIMICOS

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES |
|-------------|------------|-----------|-----------|------------|
| PTHi | 188±248 | 179±197 | 208±294 | 211±321 |
| 1.25 (OH)D3 | 9.9±10.2 | 40.2±32.1 | 44.3±23.7 | 26.5±10.4 |
| Calcio | 10.47±1.31 | 9.7±0.83 | 9.98±0.67 | 10.17±0.78 |
| Fósforo | 5.42±2.1 | 3.7±2.23 | 3.4±0.92 | 3.7±0.79 |
| F Alcalinas | 184±96 | 401±257 | 255±98 | 219±111 |
| Aluminio | 42±30 | 18±16 | 19±9 | 16±17 |
| Creatinina | 9.8±3.2 | 2.1±1.51 | 2.01±1.17 | 1.63±0.82 |

de la normalidad. Los niveles de fosfatasas alcalinas permanecían elevados a los 6 meses pero se habían normalizado a los 12 meses. Los niveles de PTHi permanecen elevados durante todo el período de estudio.

En la tabla II se muestra que los pacientes que en el momento del trasplante presentaban un hiperparatiroidismo moderado-severo (cifras de PTHi superiores a 250 pg/ml.) no lograron corregirlo a lo largo del estudio.

TABLA II
EVOLUCION HIPERPARATIROIDISMO

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES |
|----------|---------|---------|----------|----------|
| PTHi>250 | 547±333 | 610±260 | 677±526 | 707±517 |
| PTHi<250 | 95±55 | 77±42 | 94±55 | 92±84 |

Los resultados de la DMO, expresados como z-score se encuentran agrupados en las tablas III, IV y V. Tal como se ya se ha comentado anteriormente, en el momento del trasplante, los pacientes en Hemodiálisis tienen una DMO similar a la población general, excepto los afectados por Hiperparatiroidismo moderado-severo (PTHi>250 pg/ml.). Durante los primeros 6 meses post-trasplante se observa una disminución de la DMO en todos los pacientes (p < 0.01) (tabla III), que alcanza niveles más bajos en los pacientes con hiperparatiroidismo mo-

TABLA III
DENSITOMETRIA OSEA GLOBAL (Z-SCORE)

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES |
|----|------------|-------------|------------|------------|
| CL | -0.23±1.58 | -1.25±0.88* | -0.50±1.44 | -0.60±1.21 |
| CF | -0.84±1.27 | -1.41±0.78 | -0.95±1.15 | — |

CL = Columna lumbar - CF = Cuello femoral * = p<0.01

UMBRAL DE FRACTURA

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES |
|--|-------|---------|----------|----------|
| | 10% | 27% | 22% | 8% |

TABLA IV
EVOLUCION DMO (Z-SCORE): HPT VERSUS NO HPT

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES |
|--------|------------|-------------|------------|------------|
| CL HPT | -1.19±1.38 | -2.20±0.57 | -1.36±1.48 | -1.14±1.06 |
| No HPT | 0.05±1.54 | -1.61±1.43* | -0.58±1.48 | -0.33±1.23 |
| CF HPT | -0.91±1.22 | -1.3±1.25 | -1.48±0.95 | — |
| No HPT | -0.76±1.33 | -1.21±1.3 | -0.9±1.49 | — |

CL = Columna lumbar - CF = Cuello femoral * = p<0.01

derado-severo (tabla IV). A los 12 meses se evidencia una progresiva recuperación de la DMO. El efecto negativo de los esteroides se puede ver claramente en la tabla V. A los 6 y 12 meses la DMO fue significativamente menor en los pacientes que recibieron esteroides.

La disminución de DMO no se correlacionó con la severidad del hiperparatiroidismo, aunque estos pacientes alcanzaron niveles de DMO más bajos y mantenidos. En el momento del trasplante 7 pacientes tenían DMO por debajo del umbral de fractura y a los 6 meses había 22 dentro de los cuales estaban todos los pacientes afectados de Hiperparatiroidismo severo (Tabla III).

La pérdida de DMO se correlacionó significativamente con la dosis acumulativa de esteroides (p < 0.01).

La pérdida de DMO no se correlacionó significativamente ni con la edad del paciente, el sexo, la enfermedad de base, el tiempo en diálisis pre-trasplante ni el grado de función renal.

Con la determinación del gen del VDR, 41 pacientes mostraron el genotipo favorable bb, 46 el genotipo BB y 14 el genotipo desfavorable BB. Agrupados los pacientes

TABLA V
EVOLUCION DMO (Z-SCORE): ESTEROIDES VERSUS NO ESTEROIDES

| | BASAL | 6 MESES | | 12 MESES | | 24 MESES | |
|----|------------|------------|--------------|------------|------------|-----------|------------|
| | | No S | Esteroides | No S | Esteroides | No S | Esteroides |
| CL | -0.23±1.58 | -0.06±1.08 | -1.85±0.78** | -0.12±1.29 | -0.7±1.51 | -0.48±1.2 | -1.16±1.2 |
| CF | -0.84±1.27 | -0.79±1.09 | -1.72±0.62* | -0.68±1.26 | -1.09±1.19 | — | — |

CL = Columna lumbar - CF = Cuello femoral - No S = No esteroides

* = p<0.05 - ** = p<0.01

TABLA VI
EVOLUCION PARAMETROS METABOLISMO OSEO
SEGUN GENOTIPO VDR

| | BASAL | 6 MESES | 12 MESES | 24 MESES | |
|------|-------|---------|----------|----------|----------|
| PTHi | bb | 196±143 | 167±178 | 257±386 | 304±403 |
| | bB | 182±210 | 175±170 | 238±399 | 168±259 |
| | BB | 102±62 | 98±54 | 115±76 | 96±67 |
| Ca | bb | 9.6±1.4 | 9.9±1.4 | 10.1±1.1 | 10.2±1.1 |
| | bB | 9.5±1.6 | 9.5±1.3 | 10.4±0.7 | 10.4±0.9 |
| | BB | 9.7±1.1 | 10.2±0.4 | 10.3±0.5 | 10.2±0.3 |
| P | bb | 4±1.9 | 4.2±1.7 | 3.7±1 | 4±1 |
| | bB | 3.9±1.7 | 3.6±1.6 | 3.5±1 | 3.5±0.6 |
| | BB | 3.4±1.5 | 3.4±1.7 | 3.7±0.9 | 3.2±0.3 |
| AP | bb | 140±72 | 162±67 | 334±198 | 253±107 |
| | bB | 144±81 | 189±137 | 231±103 | 217±102 |
| | BB | 131±59 | 143±63 | 233±107 | 182±72 |

TABLA VII
EVOLUCION DMO (Z-SCORE) SEGUN GENOTIPOS

| | BASAL | 12 MESES | 24 MESES |
|----|------------|------------|------------|
| bb | -0.27±1.71 | -1.10±1.59 | -0.77±1.51 |
| BB | -0.56±1.46 | -0.75±1.37 | -0.79±1.32 |
| bB | -0.36±1.25 | -1.09±1.45 | -1.29±1.08 |

según diferentes genotipos (bb,bB,BB)7 los parámetros clínicos fueron similares en cuanto a edad, sexo, tiempo en diálisis y tratamiento inmunosupresor. Los parámetros bioquímicos basales, así como su evolución a los 6, 12 y 24 meses, no mostraron diferencias significativas, aunque existen cifras más elevadas de PTHi en los pacientes con el alelo favorable (bb) (Tabla VI). No hubo diferencias significativas en la DMO basal de los diferentes genotipos, así como en su evolución a los 12 y 24 meses, aunque los pacientes con el alelo favorable pre-

TABLA VIII
EVOLUCION DMO (Z-SCORE).
GENOTIPO/HPT/INMUNOSUPRESION

| | BASAL | 12 MONTHS | 24 MONTHS | |
|----|------------------|------------|------------|------------|
| bb | S + CyA / No HPT | -0.52±1.46 | -0.63±1.28 | -0.89±1.06 |
| | CyA / No HPT | 0.80±1.6 | 0.02±1.7 | 0.73±1.08 |
| | HPT | -0.64±2.17 | -2.19±1.59 | -1.84±1.56 |
| BB | S + CyA / No HPT | -1.02±1.40 | -1.32±1.14 | -1.29±0.98 |
| | CyA / No HPT | 0.83±0.12 | 0.69±0.49 | 0.72±1.2 |
| bB | S + CyA / No HPT | -0.02±1.03 | -0.51±1.18 | -0.96±0.96 |
| | CyA / No HPT | 0.24±0.79 | -0.66±1.20 | -0.44±0.94 |
| | HPT | -1.63±1.24 | -2.78±1.16 | -2.49±0.59 |

S + Esteroides - CyA = Ciclosporina A - HPT = Hiperparatiroidismo

sentaron en todo momento menor pérdida de masa ósea (Tabla VII). Se observó, entre los diferentes genotipos, mayor influencia del hiperparatiroidismo secundario severo y del tratamiento esteroideo en la pérdida de DMO (Tabla VIII).

Discusión

La Osteodistrofia renal es una complicación relevante de la Insuficiencia Renal Crónica, debida esencialmente a alteraciones en la síntesis-secreción de hormona paratiroidea y metabolismo de la vitamina D.

El trasplante renal funcionante, a pesar de que restituye el metabolismo mineral óseo y los factores etiológicos que conducen a la osteodistrofia renal, provoca una persistente pérdida de masa ósea, como han demostrado recientemente algunos estudios (16, 29). Esta persistencia de la patología ósea se ha atribuido al efecto negativo que sobre el metabolismo óseo puede tener la terapia inmunosupresora, especialmente en el caso de los esteroides.

El presente estudio corrobora, en pacientes no seleccionados que seguían programa de Hemodiálisis periódica y recibieron un injerto renal de donante cadáver que, tras el trasplante renal, se produce una pérdida aguda de densidad mineral ósea que tiende a recuperarse a partir de los seis meses post-trasplante. Según nuestro estudio, esta pérdida claramente se relaciona con el tratamiento esteroideo y con el hiperparatiroidismo preexistente.

Los esteroides tienen un efecto negativo sobre el metabolismo óseo mineral, dependiente tanto de la dosis diaria como de la dosis acumulativa. El hueso cortical, sin embargo, parece estar desproporcionadamente preservado con el tratamiento esteroideo. La pérdida de densidad mineral ósea observada en el presente estudio fue más severa durante los 6 primeros meses, relacionada claramente con una mayor dosis diaria de esteroides durante este período. Se ha demostrado también que los pacientes que no recibieron tratamiento esteroideo (Ciclosporina en monoterapia) no presentaron descenso significativo de densidad mineral ósea durante este período, confirmando con ello el mínimo efecto que ejerce la Ciclosporina sobre el metabolismo mineral óseo y el evidente efecto negativo del tratamiento esteroideo.

El hiperparatiroidismo secundario constituye el segundo factor negativo en el metabolismo mineral óseo tras el trasplante renal. En este estudio se ha confirmado, por un lado, la persistencia en el tiempo de unos niveles discretamente elevados de PTH y por otro, la no corrección, tras la normalización del funcionalismo renal, del hiperparatiroidismo moderado-severo en los pacientes que lo presentaban. Esta persistencia obedece fundamentalmente a dos motivos, por un lado es evidente que muchos de los pacientes trasplantados, presentan un grado de función renal que, si bien es suficiente para permitirles una situación clínica satisfactoria, no es apropiada para revertir totalmente las anomalías del metabolismo del

Calcitriol, por otro lado, la hiperplasia de las células paratiroides de la etapa pre-trasplante no revierte de forma inmediata aun con función renal normalizada y mantiene una hipersecreción de PTH a pesar de encontrarnos con calcemias normales o incluso elevadas (37, 39).

La importante pérdida de densidad mineral ósea a nivel de columna lumbar en los pacientes con hiperparatiroidismo sugiere que el hueso trabecular es más vulnerable a la acción de la PTH. Por contra, de los resultados se desprende que los niveles discretamente elevados de PTH parecen ejercer un efecto protector contra el negativo efecto de los esteroides.

Es conocida, por otra parte, la influencia que sobre la masa ósea poseen los factores genéticos. En individuos normales, las variantes alélicas del gen del VDR se han empleado para predecir diferencias en la densidad mineral ósea (32, 33). En nuestro estudio, las frecuencias genotípicas fueron similares a las ya reportadas en poblaciones de Australia (32), Estados Unidos (40) y Europa (41, 42). En el momento del trasplante, la densidad mineral ósea de los pacientes agrupados según los diferentes genotipos fue similar, no pudiendo encontrar diferencias significativas entre ellos al finalizar el estudio, aunque en los pacientes con monoterapia se manifestó una tendencia de cara a una mayor recuperación de masa ósea en los pacientes con el genotipo favorable bb.

Aunque diferentes estudios realizados en diferentes poblaciones han mostrado una gran relación entre el polimorfismo del gen del VDR y la masa ósea (32,36), los resultados no son uniformes, y otros estudios no han encontrado tal relación (40-42). El hecho de que nosotros no hayamos encontrado una relación significativa entre el genotipo del VDR y la masa ósea tras el trasplante sugiere que, al igual que ocurre en otras patologías multifactoriales, la expresión fenotípica se encuentra sustancialmente modificada por factores ambientales, en nuestro caso estos factores de mayor peso los constituyen las dosis de esteroides o el hiperparatiroidismo secundario severo.

Los mecanismos moleculares a través de los cuales la densidad y el turnover óseos son regulados por el gen VDR no están claros y son necesarios otros estudios para establecer la relación entre el polimorfismo Bsm1 y la función del producto del gen VDR. Existe la posibilidad de que, diferencias de alelos en la región 3' del gen VDR puedan alterar la eficiencia transcripcional del gen o la estabilidad del mRNA transcrito (32). En mujeres BB se han observado niveles circulantes de calcitriol más elevados que pueden ser una respuesta de adaptación a la función VDR alterada (32, 43). En nuestro estudio, los niveles de calcitriol un año después del trasplante fueron también ligeramente más elevados en el grupo con genotipo Bb o BB y esto podría contribuir a acelerar el remodelado óseo y una menor densidad ósea mineral.

Como conclusiones podemos decir que nuestro trabajo corrobora que, tras el trasplante renal, se produce una pérdida aguda de densidad mineral ósea, que tiende a recuperarse a partir de los seis meses post-trasplante. Se

confirma que el principal responsable de esta pérdida de densidad mineral ósea lo constituye el tratamiento esteroideo. Se constata la persistencia en el tiempo del hiperparatiroidismo secundario y su, también, efecto negativo sobre la evolución de la masa ósea. Se constata también la mínima influencia de los diferentes alelos del gen del receptor de la vitamina D sobre la evolución de la masa ósea post trasplante renal y se demuestra la alta fiabilidad de la DEXA en la monitorización de la evolución de la densidad mineral ósea, con una gran precisión y sensibilidad en la medición de columna lumbar, pudiendo obviarse, a efectos de seguimiento en la práctica clínica, la medición de cuello femoral.

El manejo de la enfermedad ósea post-trasplante es por tanto complejo debido a las alteraciones óseas preexistentes, la persistencia del hiperparatiroidismo secundario y el tratamiento con esteroides. El marcado descenso de la densidad mineral ósea en el post-trasplante inmediato, con gran porcentaje de pacientes por debajo del umbral de fractura, sugiere que debería considerarse la prevención desde el inicio, especialmente en los pacientes con hiperparatiroidismo secundario severo o que reciban altas dosis de esteroides. El efecto beneficioso mostrado por el Calcitriol en pacientes con osteoporosis esteroidea (44) y postmenopáusica (45), junto al conocido efecto de bloqueo de la hiperproducción de PTH (10, 46), convierten a esta droga en una atractiva opción terapéutica a considerar en la prevención de la pérdida de densidad mineral ósea post-trasplante.

Bibliografía

1. Parfitt AM. Are bone problems of dialysis patients always solved by renal transplantation?. In: Zackson DA ed. Cases in metabolic bone disease. New York: Education in Practice, 1986.
2. Coburn JW, Slatopolsky E. Vitamin D, Parathyroid hormone and the Renal Osteodystrophies. En: Brenner BM and Rector FC, eds. The kidney, 4a ed. Filadelfia: W B Saunders, 1991: 2036-2120.
3. Delmez JA. Long-term complications of dialysis: Pathogenetic factors with special reference to bone. *Kidney Int* 1993;41:S116-S120.
4. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure. An evolving disorder. *Kidney Int* 1993;43:436-442.
5. Torres A. ¿Es necesaria la biopsia ósea? *Nefrología* 1992;12:210-214.
6. Torres A, Hernández L. Osteodistrofia renal. En: Farreras P, Rozman C, eds. Medicina Interna, 12a ed. Barcelona. Ediciones Doyma, 1992:1096-1099.
7. Ritz E, Malluche HH, Krempien B, et al. Calcium metabolism in renal failure. En: Disorders of Mineral Metabolism, vol III. Ed. F Bronner y JW Coburn. Academic Press, New York, 1981:152.
8. Brown EM, Wilson RE, Eastman RC, Pallota J, Marynick SP. Abnormal regulation of parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983;56:572-581.

9. Dunlay R, Rodríguez M, Felsenfeld AJ, Llach F: Direct inhibitory effect of calcitriol on parathyroid function (sigmoidal curve) in dialysis. *Kidney Int* 1989;36:1093-1098.
10. Hernández D, Concepción MT, Lorenzo V, et al. Non aluminic aplastic bone disease in predialysis patients: Prevalence and evolution after maintenance dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 1994;9:517-523.
11. Torregrosa JV, Campistol JM, Mas M, Utilidad del acetato cálcico como quelante del fósforo en pacientes en Hemodiálisis con hiperparatiroidismo secundario. *An Med Intern* 1995;12:377-81.
12. Maloney N, Ott S, Alfrey A, Miller N, Coburn J, Sheppard D. Histological quantitation of aluminum in iliac bone from patients with renal failure. *J Lab Clin Med*, 1982; 99:206-216.
13. Torregrosa JV, Almirall J, Arrizabalaga P, et al. Treatment of secondary hiperparathyroidism with intravenous vitamin D3 bolus. *Bone* 1993; 14:77-79.
14. Torres A, Lorenzo V, González-Posada JM, et al. Comparison of histomorphometry and computerized tomography of the spine in quantitating trabecular bone in renal osteodystrophy. *Nephron* 1986;44:28Z-287.
15. Julian BA, Quarles LD, Niemann KMW. Musculoskeletal complications after renal transplantation: Pathogenesis and treatment. *Am J Kidney Dis* 1992;19:99.
16. Julian BA, Laskow DA, Dubovsky J, et al. Rapid loss of vertebral mineral density after renal transplantation. *N Engl J Med* 1991;325:544-550.
17. Laan RJFM, van Riel PLCM, van de Putte LBA, et al. Low dose Prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1993; 119:963-968.
18. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid induced osteoporosis: Pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 1990;112:352.
19. Sambrook P, Birmingham J, Kempster S, et al. Corticosteroid effects on proximal femur bone loss. *J Bone Miner Res* 1990;5:1211.
20. Zelissen PMJ, Crougths RJM, van Rijk PP, Raymakers JA. Efficacy of glucocorticoid replacement therapy on bone mineral density in patients with Addison disease. *Ann Intern Med* 1994;120:207-210.
21. Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, et al. Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. *Endocrinology* 1988;123:2571.
22. Alhava EM. Bone density measurements. *Calcif Tissue Int* 1991;49:S21-S23.
23. Genant HK, Faulkner KG, Gluer CC, Engelke K. Bone densitometry: Current assessment. *Osteoporos Int*, 1993; 1:91-97.
24. Lang P, Steiger P, Faulkner K, et al. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1991;29:49-76.
25. Pons F, Castelo-Branco C, Muxi A. Técnicas no invasivas de valoración de la masa ósea: Revisión comparativa. *Actualidad Obstétrica Ginecológica* 1990;2:268-272.
26. Johnston CC, Slemenda CW, Melton LJ. Clinical use of bone densitometry. *N Engl J Med* 1991;324: 1105.
27. Reinbold WD, Genant HK, Reiser UJ, et al. Bone mineral content in early-postmenopausal and postmenopausal osteoporotic women: comparison of measurement methods. *Radiology*, 1986; 160:469-478.
28. Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *Human pathology*. 1984; 15:306-323.
29. Torregrosa JV, Campistol JM, Montesinos M, et al. Bone mineral density in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:111-113.
30. Sartoris DJ, Resnick D. Current and innovative methods for noninvasive bone densitometry. *Radiol Clin North Am*, 1990;28:257-278.
31. Sartoris DJ, Resnick D. Dual-energy radiographic absorptiometry for bone densitometry: current status and perspective. *Am J Roentgenol*. 1989;152:241-246.
32. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284-87.
33. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, et al. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6665-9.
34. Yamagata Z, Miyamura T, Iijima S et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet* 1994;344: 1027-29.
35. Krall EA, Parry P, Lichter JB, et al. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Min Res* 1995;10:978-84.
36. Ferrari S, Rizzoli R, Chevalley T, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet* 1995;345:423-24.
37. Pietschmann P, Vychytil A, Woloszczuk W, Kovarik J. Bone metabolism in patients with functioning kidney grafts: increased serum levels of osteocalcin and parathyroid hormone despite normalisation of kidney function. *Nephron* 1991;59:533.
38. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. New York, Elsevier, 1986:44.
39. McCarron DA, Muther RS, Lenfesty B, Bennet WM. Parathyroid function in persistent hyperparathyroidism: relationship to gland size. *Kidney Int* 1982;22:662.
40. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, et al. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994;94:2130-34.
41. Melhus H, Kindmark A, Amer S, et al. Vitamin D receptors genotype in osteoporosis. *Lancet* 1994;344:949-50.
42. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* 1995;10:1283-88.
43. Howard G, Nguyen T, Morrison N, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor alleles in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2800-2805.
44. Jowell P, Epstein S, Fallon MD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D modulates glucocorticoid-induced alterations in serum bone Gla protein and bone histomorphometry. *Endocrinology* 1987;120:531.
45. Tilyard MW, Spears GFS, Thomson J, Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N Engl J Med* 1992;326:357.
46. Ruedin P, Rizzoli R, Slosman D, et al. Effects of oral calcitriol on bone mineral density in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int* 1994;45:245-252.