



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO MEDICINA, DERMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA

TESIS DOCTORAL:

EFFECTO DE LOS SUPLEMENTOS DE CALCIO,
VITAMINA D E ISOFLAVONAS SOBRE
MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO EN
MUJERES POSTMENOPÁUSICAS RECIENTES.
PAPEL DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE
VITAMINA D

**Presentada por MARIA PÉREZ ALONSO
para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid**

**Dirigida por:
Prof Dr. D. Daniel Antonio de Luis
Prof Dr. D. Antonio Dueñas Laita**

D. DANIEL DE LUIS ROMAN, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y JEFE DE SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID Y **D. ANTONIO DUEÑAS LAITA**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y JEFE DE LA UNIDAD REGIONAL DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RÍO HORTEGA

CERTIFICAN

Que el trabajo realizado como proyecto de Tesis Doctoral por D. MARÍA PÉREZ ALONSO titulado “ Efecto de los suplementos de calcio, vitamina D e isoflavonas sobre marcadores del remodelado óseo en mujeres postmenopáusicas recientes. Papel de polimorfismos del receptor de la vitamina D “ ha sido desarrollado bajo nuestra dirección cumpliendo todos los requisitos de originalidad y calidad científica, según establece el RD que regula los estudios de tercer ciclo, para poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Y para que conste, a todos los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Valladolid a 1 de Marzo de 2016

Fdo Prof De Luis

Fdo Prof Dueñas Laita

Agradecimientos

A los directores de la tesis, Prof De Luis y Prof Dueñas, por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo

A la Dra Laisa Briongos y a D. Florentino Pinacho por su ayuda en la recogida de los datos clínicos de los pacientes

Al Prof Olmos, Hospital Marqués de Valdecilla-Universidad de Cantabria, por la realización de las determinaciones analíticas de metabolismo óseo. A la Dra María Torres del CEGEN por la realización de estudios genéticos

Al Dr Manuel Gonzalez Sagredo por su ayuda en el estudio estadístico y al Dr Eladio Velasco por su ayuda en la realización de los haplotipos

A los médicos de Atención Primaria del área oeste de Valladolid y a las mujeres que participaron en el estudio

INDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	25
FISIOPATOLOGÍA OSTEOPOROSIS	30
Remodelado óseo	30
CÉLULAS QUE INTERVIENEN	32
Osteocitos	32
Osteoclastos	33
Osteoblastos	35
MECANISMOS DE OSTEOPOROSIS	38
MEDIDAS DEL REMODELADO ÓSEO	39
CALCIO	42
Calcio y masa ósea	44
Efectos terapéuticos del calcio	44
VITAMINA D	47
Acciones de la vitamina D	49
Niveles plasmáticos de vitamina D	51
Vitamina D y fracturas	55
Vitamina D y caídas	56
Suplementos de vitamina D y fracturas	57
Receptor vitamina D	59
Regulación del receptor de vitamina D	61
ISOFLAVONAS	63
Mecanismo de acción de las isoflavonas	63
Estudios clínicos	65
SINERGIAS VITAMINA D-ISOFLAVONAS	72
HIPÓTESIS	75
OBJETIVOS	79
MÉTODOS	83
RESULTADOS	93
NUTRIGENÉTICA	128
DISCUSIÓN	149
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXOS	205

ABREVIATURAS

ATF4: Factor activador de la transcripción 4

BMP: Proteína morfogenética ósea

cmyc: Protooncogen cmyc

CTX: Telopéptido carboxiterminal

CYP2R1: Gen que codifica la 25-vitamina D hidroxilasa

CYP27R1: Enzima 25 hidroxilasa

CYP27B1: Citocromo P45027B1

CYP24A1: Gen que codifica la 24-hidroxilasa

DBP: Proteína transportadora de vitamina D

DEXA: Dual-energy X-ray absorptiometry

DKK1: Dickkopf1

DMO: Densidad Mineral Ósea

EFG-R: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FGF23: Factor de crecimiento de fibroblastos 23

FSH: Hormon foliculoestimulante

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulocito monocito

GWAS: Genome-wide association study

HH: Hedgehob

HPLC: High-performance liquid chromatography

HSC: Stem cell humanas

IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

IL-7: Interleucina 7

IL-12: Interleucina 12

INF γ : Interferon gamma

IOF: International Osteoporosis Foundation

IOM: Institute of Medicine

LRP5/LRP6: Péptido relacionado con el receptor de lipoproteína

MAPK: Kinasas de proteínas activadas por macrófagos

M-CSF: Factor estimulador de colonias macrofágico

MSC: stem cell monocito

NAFCTc1: Factor activador nuclear

NHANES III: National Health and Nutrition Examination Survey

NNT: Número necesario a tratar

NTX: Telopéptido aminoterminal

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

P1NP: Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1

PPAR γ : Receptor activador de proliferador de peroxisoma γ

PTH: Hormona paratiroidea

RANK: Receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNAm: Acido ribonucleico mensajero

RXR: Receptor Retinoide X

RUNX: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt

Src: Factor de transcripción Src

SNP: Polimorfismo nucleótido sencillo

SOST: Gen codificante de la esclerostina

SOX9: Factor de transcripción SOX9

Term2: factor de transcripción term

TGF β : Factor de crecimiento trasformante β

TH1/TH2: Linfocitos T helper 1/2

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

WHI: Women Health Initiative

Wnt: Wnt (" Wingless ")

RESUMEN

Introducción. La osteoporosis es una enfermedad de elevada prevalencia, morbimortalidad y alto coste económica que se hace clínicamente evidente cuando aparecen las fracturas características. La vitamina D juega un importante papel en el mantenimiento de la integridad del esqueleto y de la resistencia ósea, principal determinante de la aparición de fracturas. Por otra parte la incidencia de la hipovitaminosis D es muy frecuente con hiperparatiroidismo secundario asociado y aumento del remodelado óseo

Objetivos. Determinar la prevalencia de hipovitaminosis D en mujeres sanas con menopausia reciente y valorar el efecto de tres procedimientos de incrementar los niveles de vitamina D, radiación ultravioleta, suplementos de calcio y vitamina D y suplementos de calcio ,vitamina D e isoflavonas. Además se valorará el efecto de SNPs del receptor de la vitamina D sobre los niveles basales de vitamina D y la respuesta al tratamiento

Métodos. Se realizó un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego en un grupo de 152 mujeres, sanas, con

menopausia reciente. Se distribuyeron en tres grupos y se administró placebo, calcio y vitamina D, calcio-vitamina D-isoflavonas durante tres meses. Se realizaron determinaciones analíticas basales y a los tres meses. Estas analíticas incluyeron calcio, vitamina D, paratohormona y marcadores de remodelado óseo (P1NP y CTX). Además, se extrajo DNA basamente y se determinaron SNPs del receptor de la vitamina D (BsmI, ApaI, TaqI), calculándose posteriormente los haplotipos. Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS

Resultados. La prevalencia de insuficiencia de vitamina D fue del 75 % y de deficiencia de vitamina D del 39 %. Los tres procedimientos empleados incrementaron de forma estadísticamente significativa los niveles de vitamina D, disminuyeron los niveles de PTH y de PINP. Los niveles de CTX también disminuyeron pero solo de forma estadísticamente significativa con el efecto de la radiación ultravioleta. No se observaron diferencias entre los tres grupos.

Los cambios no mostraron diferencias en función de los genotipos del receptor de la vitamina D pero el

haplotipo Bat mostró niveles basales más bajos de vitamina D y una menor respuesta independiente de estos niveles basales

Conclusiones. La hipovitaminosis D en mujeres sanas postmenopáusicas recientes es elevada siendo efectivos para su incremento los tres procedimientos empleados sin observarse efecto aditivo del calcio y vitamina D y del calcio, vitamina D e isoflavona sobre la radiación ultravioleta. El haplotipo Bat se asocia a niveles basales inferiores de vitamina D y a una menor respuesta

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es una enfermedad asociada a una elevada morbimortalidad cuya incidencia se incrementa con el envejecimiento de la población. Se ha definido como un trastorno esquelético sistémico caracterizado por un deterioro de la microarquitectura ósea y un descenso de la masa ósea que determina un incremento de la fragilidad con una mayor susceptibilidad a la aparición de fracturas (1). Es una enfermedad clínicamente silente que no se manifiesta hasta que aparecen sus complicaciones, las fracturas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1994 una definición de osteoporosis basada en criterios densitométricos que trataba de facilitar la realización de estudios epidemiológicos (2). Esta definición se basaba en la comparación de los valores de densidad mineral ósea (DMO) de mujeres blancas postmenopáusicas que se comparaban con los valores medios de la población adulta joven. Esto permitió determinar un valor que se denominó T-score y permitió establecer tres categorías, normal T-score > -1 DE, osteopenia, T-score entre -1 y -2.5 y osteoporosis , T-score < -2.5 DE. La última categoría cuando se acompañaba de fractura se denominó osteoporosis establecida. Posteriormente estas categorías se establecieron como criterios diagnósticos y posible indicación de tratamiento.

Es una enfermedad que afecta tanto a varones como mujeres aunque la prevalencia es superior en estas últimas. En España se calcula que dos millones de mujeres y ochocientos mil varones padecen la enfermedad basándonos en estudios de población general realizados con DEXA (densitometría) central (3,4). La prevalencia va incrementándose con la edad. Melton et al (5) realizaron en 1995 un estudio epidemiológico en población americana encontrando una prevalencia del 15 % en mujeres de 50-59 años que se

incrementaba notablemente con el envejecimiento pudiendo superar el 80 % a partir de los 80 años (6) .

Las principales consecuencias de la osteoporosis son las fracturas por fragilidad que pueden aparecer en diferentes localizaciones aunque se consideran típicas las vertebrales, la distal de radio y la proximal de fémur (7,8). Son fracturas con un elevado coste económico y están asociadas a una mayor morbimortalidad, específicamente la vertebral y la proximal de fémur. La mortalidad por fractura de cadera, la manifestación mas grave de la osteoporosis, es del 8 % durante el primer mes tras la fractura, mortalidad aguda. Al año la mortalidad se eleva al 30 %. Por otra parte, la recuperación de aquellos pacientes que no fallecen es pobre. Únicamente un 30 % de los pacientes que sufren una fractura de cadera vuelven a la situación basal. La fractura vertebral presenta una incidencia superior a la fractura de cadera. Mientras que esta última tiene una incidencia anual de 1.3-1.9 casos/1000 habitantes/año, la vertebral es de 13.6/1000 habitantes/año en varones y 29.3 /1000 habitantes/año en mujeres (7). Aunque su mortalidad es inferior a la fractura de cadera, no es despreciable, especialmente en los pacientes con patología respiratoria asociada (9,10) .

Otro aspecto destacable es el deterioro de la calidad de vida que experimentan los pacientes con osteoporosis, específicamente si hay fracturas. Los numerosos estudios realizados muestran una menor puntuación en todas las esferas valoradas. No es solo un problema de las fracturas sino la sensación de padecer una enfermedad crónica que requiere tratamiento. Este puede, a su vez, tener efectos adversos y no garantiza la eliminación del riesgo en el 100 % de los casos.

El tercer elemento clave en la importancia de esta enfermedad es su coste económico. Este puede dividirse en distintos apartados. En primer lugar el derivado del diagnóstico y tratamiento. Los diferentes fármacos empleados tienen un coste anual que oscila entre 250 y 5100 euros siendo tratamientos prolongados que en algunos casos duran más de 10 años en función del riesgo del paciente. Un segundo elemento de gasto es el derivado de la propia fractura, directo e indirecto. El directo deriva de la atención a la fractura, cirugía y hospitalización, mientras que el indirecto guarda relación con los cuidados posteriores. No disponemos en España de datos exactos del número de fracturas osteoporóticas. Se estimaban en el año 2000 alrededor de 100000 fracturas con un coste directo superior a 126 millones de euros e indirectos de 420 millones de euros. Datos recientes han incrementado notablemente el gasto, especialmente para la fractura de cadera, con costes directos por encima de los 25000 millones e indirectos de 15000 millones en los años siguientes (11).

La osteoporosis es una enfermedad grave, con elevada mortalidad y un notable gasto económico. Por ello, son necesarias medidas destinadas a disminuir su incidencia, especialmente en los periodos con una mayor pérdida de masa ósea, periodo perimenopáusico y menopausia precoz en la mujer

FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS

Remodelado óseo

El hueso es uno de los tejidos metabólicamente más activos que se renueva de forma continua para mantener sano el esqueleto. Básicamente el hueso tiene tres funciones fundamentales:

- Soporte para los músculos
- Protección de órganos vitales
- Reservorio de calcio y fósforo para llevar a cabo diversas funciones metabólicas

Podemos distinguir dos grandes tipos de hueso, cortical (funciones mecánicas y protectoras de órganos vitales) y trabecular (función metabólica).

El remodelado óseo tiene como función mantener el hueso biomecánicamente estable y es llevado a cabo en una estructura anatómica y funcional denominada unidad de remodelación ósea (URO). En estas unidades participan cuatro tipos de células, células óseas de revestimiento, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos. Las células de revestimiento tapizan la superficie ósea durante la fase estable del remodelado, siendo células de estirpe osteoblástica. Los osteocitos son las células más numerosas siendo una célula clave en este proceso. Actúan como mecanostato detectando aquellas zonas de debilidad del esqueleto y enviando las señales necesarias para iniciar el proceso. Derivan de los osteoblastos que han quedado enterrados en la matriz

ósea. Los osteoclastos son células multinucleadas que llevan a cabo la resorción ósea y mantienen comunicación con los osteoblastos para regular el proceso de formación ósea (12) . El ciclo del remodelado dura 120 días y consta de las siguientes fases:

1. Fase 1: Iniciación/activación del remodelado en un lugar específico
2. Fase 2. Resorción ósea y reclutamiento de stem cell mesenquimales y progenitoras de osteoblastos
3. Fase 3. Diferenciación y activación de los osteoblastos con síntesis de osteoide
4. Fase 4. Mineralización del osteoide

Reciente se ha descrito que las UROs están directamente en contacto con vasos, región muy vascularizada , y está tapizada por un “ dosel “ formado por células de revestimiento (Figura 1)

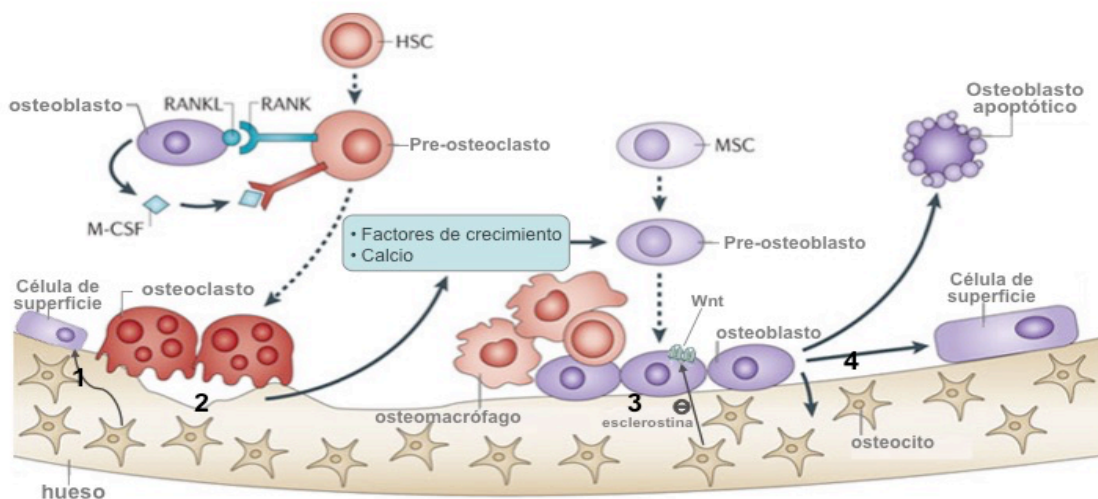


Figura 1. Remodelado óseo(Adaptado de Weilbacher KN et al. Nat Rev Cancer 2011)

CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN EL REMODELADO ÓSEO

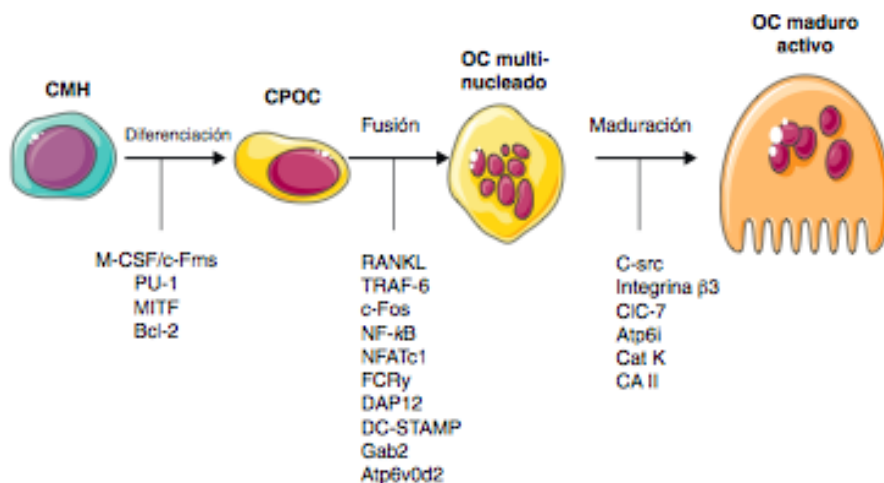
Osteocitos

Son células derivadas de los osteoblastos que quedan incluidos dentro de la matriz ósea de tal manera que aproximadamente entre el 5 y el 20 % de los osteoblastos se transforman en osteocitos (13). Estas células expresan los mismos genes que los osteoblastos aunque a diferentes niveles siendo además rico en genes relacionados con la mineralización ósea y el metabolismo del fósforo. Se localizan en lagunas exhibiendo procesos dendríticos citoplasmáticos que se localizan en canalículos dentro de la matriz ósea permitiendo la comunicación intercelular. Además, de relacionarse con células ósea, se comunican con vasos sanguíneos. Estas células se comportan como mecanostatos siendo capaces de responder a las fuerzas mecánicas regulando la formación y resorción ósea (14). Son los principales productores de esclerostina, derivada del gen SOST. La esclerostina antagoniza a varios miembros de las proteínas óseas morfogenéticas y se une a LPR5/LPR6 bloqueando la vía canónica Wnt (15) . Además de bloquear la formación ósea, también sería capaz de iniciar el proceso de resorción, bien segregando RANKL o de forma indirecta, tras su apoptosis, estimulando la producción de RANKL por osteoblastos o células de estirpe osteoblástica (16) . Estas células son capaces de producir osteoprotegerina que compite con RANKL y bloquea la resorción.

Osteoclastos

Es una célula derivada del sistema hematopoyético que tiene dos funciones principales, resorción ósea e inicio de la formación mediante comunicación con los osteoblastos. Se dirige a las unidades de remodelado bien desde la médula ósea bien a partir de precursores localizados en torrente circulatorio (17). En su superficie posee numerosos receptores que van a determinar su proliferación, diferenciación y supervivencia. El más importante de ellos es el receptor RANK, lugar de unión de RANKL. La unión RANK/RANKL activa diferentes quinasas cuya vía final es el factor NFATc1 que es traslocado al interior del núcleo activando genes que intervienen en la proliferación y maduración del osteoclasto (18). Otros receptores importantes son el receptor para TNFalfa, Src y TERM2 que van a cooperar en la activación de NFATc1 (19). (Figura 2)

Figura 2. Proliferación y maduración de los osteoclastos (Henriksen K et al. Endocr Rev 2011; 32: 31-63)



Para llevar a cabo su acción resortiva el osteoclasto necesita activarse. En primer lugar debe adherirse a la superficie ósea, función realizada por los

podosomas con participación de unas moléculas llamadas integrinas. Su adhesión, mediante una zona de sellado, crea la laguna de resorción. En la misma se liberan iones hidrógeno que acidifican el medio y permiten la activación de enzimas como la catepsina que degrada la matriz ósea. Posteriormente se reabsorbe el material desprendido (colágeno y calcio) que son trasportados al interior del osteoclasto y posteriormente liberados al exterior (17) . Una vez completado el proceso se produce la apoptosis o muerte celular programada del mismo. (Figura 3)

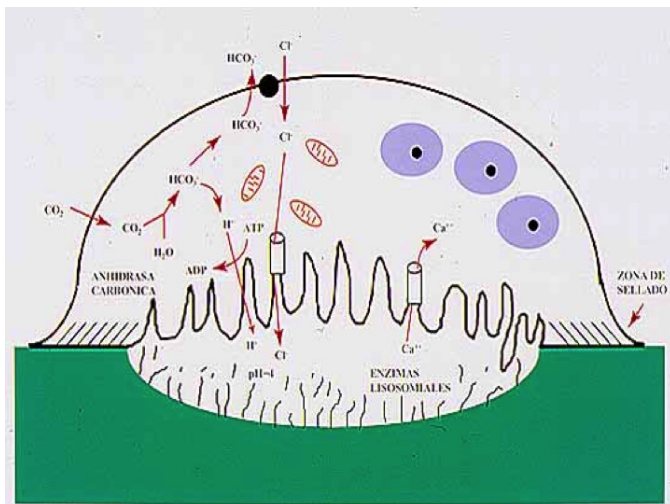


Figura 3. Osteoclasto (Tomado de Serrano S. Estructura y función del hueso normal. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica 1998)



Figura 4. Comunicación osteoclasto-osteoblasto

Sin embargo, antes de producirse este fenómeno es necesario que se produzca la activación de los osteoblastos (20) . Esta activación se lleva a cabo de tres formas (Figura 4):

1. Liberación de factores de crecimiento embebidos en la matriz ósea denominadas matricinas siendo las más importantes $TGF\beta$, IGF-1, BMP2
2. Contacto célula-célula (osteoclasto-osteoblasto) a través de proteínas transmembranas como el sistema de las efrinas
3. Liberación de osteoclastocinas que pueden ser estimuladoras como esfingosina-1-fosfato, BMP6, Wnt10b y Efrina B_2 o inhibidoras como la semaforina 4D

Osteoblastos

Los osteoblastos son células derivadas de progenitores mesenquimales donde podemos distinguir varias poblaciones, precursores de los osteoblastos que acuden a la laguna de resorción atraídos por sustancias liberadas de la matriz ósea, células osteoblásticas de superficie que se retraen tras recibir información de los osteocitos para que puedan actuar los osteoclastos,

osteoblastos maduros y osteocitos, osteoblastos enterrados en la matriz ósea (21).

Los osteoblastos son células con citoplasma basófilo, abundantes mitocondrias y aparato de Golgi muy desarrollado. Esta estructura explica su capacidad para sintetizar proteínas como la fosfatasa alcalina, osteocalcina y gran cantidad de colágeno tipo I. Este último forma el osteoide que posteriormente es mineralizado con cristales de hidroxapatita cálcica. En su proceso de diferenciación y maduración intervienen diversos factores de transcripción entre los que podemos destacar SOX9, RUNX2, ATF-4, factores de transcripción de la familia ATF-4. SOX9 no es expresado en osteoblastos maduros pero favorece la diferenciación desde preosteoblastos. RUNX2 es un factor, implicado no solamente en la diferenciación sino en la función de los osteoblastos maduros (22) . ATF-4 regula la expresión de osteocalcina, proteína osteoblástica que interviene en la regulación de la glucosa y de RANKL, que promueve la diferenciación y función del osteoblasto. Todos estos factores de transcripción son activados a través de factores exógenos ($TGF\beta$, IGF1, FGF) que activan diferentes vías metabólicas (20, 23) . $TGF\beta$ es liberado de la matriz ósea durante el proceso de resorción , facilitando la proliferación de precursores de osteoblastos así como la llegada de los mismos a la laguna de resorción. Además, estimula la proliferación y función de los osteoblastos incrementando la síntesis de matriz, inhibe la maduración tardía de osteoblastos, la apoptosis de osteocitos y regula la relación osteoblasto/osteoclasto. IGF-1 tiene una función anabólica incrementando la maduración del osteoblasto y favoreciendo la quimiotaxis de precursores. El factor de crecimiento fibroblástico comprende una larga familia de proteínas, 22, que tienen una acción anabólica como el FGF2 y el 10 mientras que el

FGF23 regula el metabolismo del fósforo (24) . Actúan sobre receptores localizados en la superficie de preosteoblastos y osteoblastos favoreciendo su diferenciación y maduración. (Figura 5)

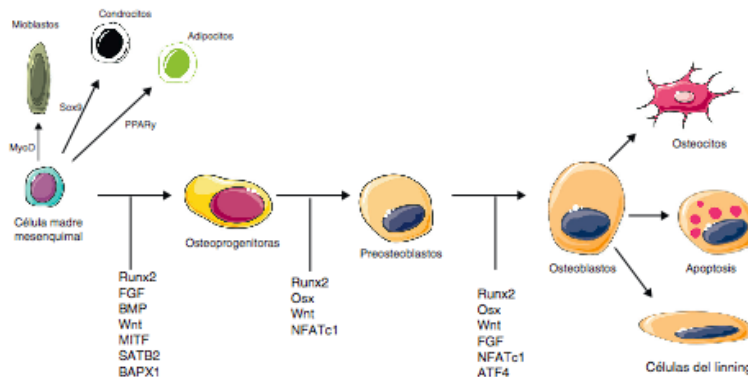


Figura 5. Figuración y maduración de osteoblastos (Tomado de Yamaguchi A et al. Endocr 2000; 21: 393-341)

Todas estas proteínas actúan sobre receptores localizados en la superficie del osteoblasto, activando diversas vías metabólicas que estimulan los factores de transcripción previamente descritos. Destacar la vía metabólica Notch, la vía de proteínas Hedgehog (HH), vía Wnt y vía BMP (20) .

La vía metabólica que ha despertado un mayor interés desde el punto de vista farmacológico es la vía Wnt. La familia Wnt son un grupo de proteínas implicadas en el sistema osteoformador de los osteoblastos. Tiene un sistema de señalización β -catenina dependiente y otro independiente. Inicialmente Wnt se une a receptores Friezled y a sus coreceptores (LPR5 o LPR6) estabilizando la β -catenina que es traslocada al nucleo y estimula genes responsables del proceso de maduración de los osteoblastos. Esta asociación es regulada por inhibidores como la esclerostina o DKK1 (25,26) . Existe una segunda vía de señalización, independiente de la β -catetina, que induce

actividad de fosfatidilinositol acoplado a proteína G , activando ProteinKinasa C que promueve la actividad osteoblástica en un proceso modulado por RUNX2. Además elementos de la vía Wnt como Wnt5A o Wnt10A promueven la diferenciación osteoblástica inhibiendo la diferenciación adipogénica (27)

MECANISMOS DE OSTEOPOROSIS

Las dos formas más frecuentes de osteoporosis son la osteoporosis postmenopáusica y la osteoporosis senil o involutiva. El comportamiento del remodelado es diferente. En la osteoporosis postmenopáusica se producen dos situaciones, aumento de la actividad de los osteoclastos y aumento del número de unidad de remodelación activas, mientras que en la osteoporosis involutiva predomina el descenso de formación dependiente de los osteoblastos.

La osteoporosis postmenopáusica viene determinada por la caída de estrógenos que va a determinar un incremento del número y actividad de las unidades de remodelado. Simultáneamente, en estas se produce una situación de desacoplamiento entre formación y resorción, con predominio de esta última. Esto conlleva un descenso de la cantidad y calidad ósea. El elemento clave de este proceso es el descenso de estrógenos. Estas hormonas ejercen un efecto protector sobre el hueso actuando sobre receptores estrogénicos, receptores nucleares que actúan directamente sobre el DNA y regulan la expresión de diversos genes. Existen también receptores localizados en la superficie celular. Podemos distinguir dos tipos de receptores, α y β . La diferencia entre los mismos es pequeña diferenciándose por un menor tamaño del dominio aminoterminal. La unión estrógeno-receptor provoca un cambio conformacional que determina activación o represión de los mecanismos de transcripción. Los receptores de superficie activan señales de trasducción a

través de nucleótidos cíclicos, flujo de calcio y activación de quinasas que regulan la expresión de genes (28,29) .

El descenso de estrógenos incrementa el número de osteoclastos ya que los estrógenos facilitan la apoptosis de osteoclastos. No se conoce el mecanismo que genera la apoptosis. Además, este descenso estimula la producción de TNF α e IL-1 por los linfocitos T que provoca una “ up-regulation “ en la liberación de IL-7 por células B (30,32). Esta citocina actúa a nivel de osteoblastos incrementando la liberación de RANKL (32) . Esta proteína actúa sobre el receptor RANK localizado en la superficie de los precursores de osteoclastos y en osteoclastos, incrementando el número y la actividad de los mismos. TNF- α e IL-1 estimulan preosteoblastos y células del estroma que incrementa la liberación de citocinas del tipo de IL-6, factor estimulador de colonias macrofágicas (GM-CSF), IL-11. Estas citocinas incrementan la liberación de RANKL. Un segundo efecto del descenso de estrógenos es la inhibición de la liberación de osteoprotegerina, proteína que bloquea la unión de RANKL a RANK. El resultado es un desequilibrio entre RANKL y osteoprotegerina con un predominio de la actividad RANKL. El resultado es un aumento del número y la actividad de los osteoclastos. Ello conlleva un incremento de la destrucción ósea con pérdida de masa ósea y deterioro de la microarquitectura que disminuye la resistencia y facilita la aparición de fracturas. Posiblemente la elevación de gonadotropinas (FSH) acelera la velocidad de destrucción ósea condicionada por la caída de estrógenos.

MEDIDA DEL REMODELADO ÓSEO

La osteoporosis, como acabamos de comentar, es una enfermedad del remodelado óseo cuyas consecuencia es un descenso de la cantidad y calidad

ósea, determinantes de la resistencia. Una de las maneras de valorar la situación del remodelado óseo es la determinación de los marcadores del remodelado óseo (33) . Son pruebas de laboratorio que miden enzimas, sintetizadas por osteoblastos u osteoclastos, o bien productos obtenidos a partir de la síntesis o degradación de la matriz ósea (33) . Se pueden dividir en dos grupos:

- Marcadores de formación (Fosfatasa alcalina, Fosfatasa Alcalina Ósea, Osteocalcina, Propéptido del procolágeno tipo 1) que reflejan diferentes estadios de actividad y diferenciación osteoblástica
- Marcadores de resorción (Fosfatasa Ácida Resistente al tartrato, Crosslinks, piridinolina, deoxipiridinolina, telopéptidos aminoterminal, NTX, y telopéptidos carboxiterminal, CTX.) que reflejan la actividad osteoclástica

Los marcadores pueden ser útiles para (34) :

- Predicción de la pérdida ósea después de la menopausia pero no todos los estudios muestran resultados concordantes. Aunque a nivel individual ofrecen una información limitada, en estudios poblacionales son capaces de identificar una población de perdedores de hueso
- Predicción del riesgo de fractura. Los estudios que analizan la asociación entre altos niveles de marcadores, específicamente de marcadores de resorción e incremento del riesgo de fractura, son más consistentes.
- Predicción de la respuesta a tratamiento antiosteoporótico. Un descenso significativo de marcadores, tras tratamiento con bifosfonatos o terapia hormonal durante 3 a 6 meses , se asocia a un incremento de masa ósea a los 3 años. No está claro que niveles de marcadores deben ser

alcanzados pero se considera que sería razonable conseguir valores similares a los que las mujeres presentan en la premenopausia.

Como hemos comentado previamente, se disponen de numerosos marcadores pero recientemente la International Osteoporosis Foundation (IOF) y la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) han recomendado el uso de P1NP sérico como marcador de formación y CTX sérico como marcador de resorción (35).

CALCIO

El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano. Un adulto tiene entre 1-1,5 kg de calcio en su cuerpo estando la mayor parte del mismo localizado en huesos y dientes. Participa en numerosas funciones metabólicas imprescindibles para un adecuado funcionamiento del organismo. Sin embargo, en esta tesis nos vamos a ocupar de su aspecto estructural. Su regulación viene determinada por la interacción entre dos sistemas hormonales, PTH y vitamina D. El papel de otra hormona, la calcitonina, es despreciable desde el punto de vista fisiológico. La vitamina D y la PTH actúan sobre los mismos órganos diana, intestino, riñón y hueso, aunque en el intestino la PTH actúa de forma indirecta estimulando la síntesis del metabolito activo de la vitamina D. Ambos sistemas hormonales incrementan la concentración plasmática de calcio para mantenerlo dentro de un rango fisiológico (9-10,5 mg/dl).

La PTH es una hormona polipeptídica secretada por las células principales de las glándulas paratiroides. Es secretada en forma de un polipéptido de mayor tamaño, preproPTH que se transforma en proPTH y finalmente en PTH. Su liberación va a depender de los niveles de calcio iónico que es detectado por el receptor sensor del calcio. Este receptor se encuentra en diferentes localizaciones como las células principales paratiroides o células tubulares renales. La liberación de PTH incrementa los niveles de calcio a través de tres mecanismos: 1) Aumento de la reabsorción tubular de calcio; 2) Aumento de la actividad de los osteoclastos con incremento de la resorción ósea; 3) Incremento de la concentración plasmática del metabolito activo de la vitamina, 1,25-hidroxicolecalciferol.

La vitamina D es en realidad una hormona. Es sintetizada en la piel por efecto de la radiación ultravioleta a partir del 7-dihidrocolesterol. Se produce inicialmente colecalciferol que sufre dos procesos de hidroxilación. El primero se produce en el hígado originándose el 25-hidroxicolecalciferol, principal indicador de los niveles de vitamina D en el organismo. La segunda tiene lugar en el riñón mediante hidroxilación en el carbono 1, dando lugar al 1,25 dihidroxicolecalciferol, metabolito activo de la vitamina D. Este proceso es activado por la PTH. La función de la vitamina D es incrementar los niveles de calcio a través de un aumento de la absorción intestinal de calcio, incremento de la resorción ósea y de la reabsorción tubular renal. El resultado es un incremento de la concentración plasmática de calcio (36) .

Para mantener una buena salud ósea es necesario un aporte adecuado de calcio. Las recomendaciones generales de ingesta de calcio oscilan entre 1000 y 1500 mg cada 24 horas. Se indica una ingesta de 1000 mg/día para mujeres entre 25 y 50 años que no estén lactando. Para lactantes y mujeres postmenopáusicas la ingesta recomendada es de 1200-1500 mg/24 h. Recientemente la IOM (The US Institute of Medicine) indicó una ingesta de 1000 mg para todos los adultos entre 19 y 50 años. Para mujeres mayores de 50 y varones por encima de los 70 años la recomendación se eleva a 1200 mg/24 h (37) . El objetivo de esta ingesta es, junto con unos niveles adecuados de vitamina D , mantener los niveles de paratohormona dentro del rango de normalidad. La presencia de un hiperparatiroidismo secundario como consecuencia, principalmente, de bajos niveles de vitamina D, ejerce un efecto deletéreo sobre el hueso. Los niveles elevados de PTH alteran el equilibrio RANKL/OPG con un predominio de la actividad RANKL produciendo un

aumento del remodelado óseo, con un desequilibrio del acoplamiento y pérdida de la cantidad y calidad ósea (32) .

Calcio y masa ósea

Diversos estudios observacionales han mostrado que la ingesta de calcio se asocia a un incremento de la masa ósea y un mayor pico de masa ósea. El pico de masa ósea, adquirido al final de la segunda década es un determinante del riesgo de fractura en la postmenopausia. El efecto es variable y la magnitud del mismo guarda relación con el lugar donde se realiza la medición, el estadio de la madurez prepuberal cuando se realiza la intervención y la ingesta de calcio basal (38) . Sin embargo, no todos los datos son concordantes habiéndose sugerido que los efectos del calcio sobre la densidad mineral podría guardar relación con el genotipo del receptor de la vitamina D (39) . Una interacción entre genes y factores medio ambientales podría explicar, en parte, la heterogenicidad de los resultados.

Efectos terapéuticos del calcio

Desde un punto de vista fisiopatológico parece razonable reemplazar la excreción de calcio por una ingesta neta para mantener una situación de equilibrio. Siempre ha habido discrepancias, como hemos comentado previamente, sobre la ingesta necesaria de calcio y salud ósea. Una ingesta adecuada de calcio puede disminuir la incidencia de fracturas mediante un incremento de la densidad mineral ósea , una mejoría de la calidad ósea o una combinación de los mismos. Recientemente Tai et al (40) han realizado un metaanálisis donde se recoge el efecto del calcio sobre la masa ósea. Los autores revisan 59 estudios aleatorizados cuyo objetivo primario son los cambios de DMO (Densidad Mineral Ósea). Hay 15 estudios que analizan fuentes dietéticas de calcio, incluyendo 1513 individuos y 51 estudios que

valoran el calcio procedente de suplementos, 12257 participantes. Los autores observaron un incremento de DMO en cadera y cuerpo total (0,6 %-1 %) tras un año considerando el calcio dietético, obteniéndose resultados similares con los suplementos (0,7 %-1,8 %). No se observaron efectos sobre masa ósea de antebrazo, sin que los efectos se acumularan con el tiempo. A los dos años, los resultados obtenidos eran similares. Este incremento podría implicar una reducción del riesgo de fractura de un 10 %. En estudios realizados con fármacos antiresortivos potentes no se ha encontrado una correlación directa entre la reducción de fracturas y el incremento de masa ósea

El efecto observado sobre los marcadores del remodelado óseo es mayor. Los suplementos de calcio provocan una reducción de un 20 % de los marcadores. Estos son una medición indirecta de la calidad ósea, determinante de la resistencia esquelética, factor que evita la aparición de fracturas. Diversos estudios, realizados en pacientes de diferentes edades, desde los 20 a los 85 años, han mostrado un efecto similar con reducción de marcadores del remodelado y PTH (41-45) .

Los mismos autores han realizado una revisión sistemática que valoran el efecto del calcio (dieta o suplementos) sobre la reducción de fracturas (46). Los autores analizan tres tipos de estudios, calcio dietético (randomizados y cohortes) y suplementos (randomizados). Los estudios de cohortes con calcio dietético presentan en su mayor parte un resultado neutro. Los estudios randomizados con suplementos de calcio muestran una reducción del riesgo del 11 % para todas las fracturas y del 14 % para la fractura vertebral. Aplicando estos resultados, a los datos del metanálisis, el NNT (Número de Pacientes Necesarios a Tratar) con calcio para prevenir una fractura vertebral es de 489 mujeres durante 6,2 años y para prevenir una fractura de cualquier

tipo, 77 individuos durante 5,5 años. Además hay que tener en cuenta que la persistencia del tratamiento con el calcio es baja, 40%-60% al final del primer año. Con los datos presentados en este estudio no se justificaría el empleo de calcio como único tratamiento para reducir fracturas. Recientemente, Khan et al (47) han publicado un estudio de cohortes, no incluido en el metanálisis previo, donde se analizaron 45154 individuos (17045 varones y 24469 mujeres) de edades entre 40 y 64 años que fueron seguidos durante un periodo de 13 años. Se dividieron en cuartiles en función de la ingesta de calcio observándose una relación inversa entre ingesta de calcio y mortalidad, fracturas y enfermedades cardiovasculares no mortales. Las ingestas de calcio más elevadas (1076 mg/día) se asociaban a un descenso de fracturas y enfermedades cardiovasculares, incluyendo una disminución del riesgo de ictus en población no hipertensa.

Se ha observado un claro beneficio con el empleo de suplementos de calcio en un determinado grupo poblacional, mujeres frágiles con una pobre ingesta de calcio y niveles bajos de vitamina D. Este dato se sustenta en el estudio de Chapuy et al (48) realizado en Francia, en mujeres institucionalizadas, con ingesta de calcio baja (513 mg/día) y niveles de vitamina D inferiores a 20 nmol/l. La administración de calcio (1000 mg/día) y vitamina D (800 mg/día) redujo las fracturas de cadera en un 23 % y todas las fracturas en un 17 % tras tres años de tratamiento.

VITAMINA D

La vitamina D es una hormona derivada del grupo de los esteroides. Se sintetiza de forma endógena a partir del 7-dehidrocolesterol (provitamina D₃) que es convertida en 7-dehidrocoleciferol en la piel por acción de la radiación ultravioleta (49) . Una segunda fuente de vitamina D es la derivada de la dieta, de origen animal (D₃ colecalciferol) o de origen vegetal (D₂ ergocalciferol). El 7-dihidrocoleciferol se une a una proteína transportadora (DBP) alcanzando el hígado donde es metabolizada por la 25-hidroxilasa (CYP2R1 micromosomal , CYP27R1 mitocondrial) a 25-hidroxicolecalciferol (25OHD₃) (50) . Este metabolito constituye el elemento que mide los niveles de vitamina D en el organismo, debido a su elevada vida media, 3 semanas. El 25-hidroxicolecalciferol se une a DBP siendo transportado al riñón. La megalina es un receptor que media la absorción DBP-25OHD en el túbulo proximal, via endocitosis. El proceso es facilitado por ubilina. En el riñón se metaboliza a 1,25-dihidroxicolecalciferol por efecto de la α 1 hidroxilasa (CYP27B1) o a 24,25 dihidroxicolecalciferol por la 24-hidroxilasa (CYP24A1) (51) . El metabolito activo de la vitamina D es el 1,25 dihidroxicolecalciferol (Figura 6). Su síntesis es estimulada por la PTH mientras que es inhibida por FGF23 (Factor de crecimiento fibroblástico 23) (52) . Con el 24,25 dihidroxicolecalciferol ocurre una situación que podríamos denominar en espejo. La PTH inhibe su producción y FGF23 lo incrementa. La síntesis cutánea de 7 dihidrocolesterol depende de varios factores. La fotosíntesis produce el 100 % de la vitamina D requerida. La exposición a la radiación ultravioleta (295-300 nm de rango fotoquímico). Otro factor implicado es la latitud que determina el ángulo de incidencia de la radiación solar sobre la piel. Se había

descrito una relación inversa, sin embargo un reciente metanálisis que incluyó 394 estudios no encontró relación entre latitud y vitamina D (53). También se ha observado una relación inversa con la coloración de la piel y la edad. La síntesis cutánea disminuye en un 50 % a partir de los 50 años, disminuyendo al 25 % a partir de los 70 años. Otro elemento que interviene , aunque en menor medida, es la ingesta de vitamina D aunque hay que tener en cuenta que la mayoría de los alimentos contienen escasa cantidad de vitamina D excepto el aceite de hígado de bacalao, la carne y los huevos (54) .

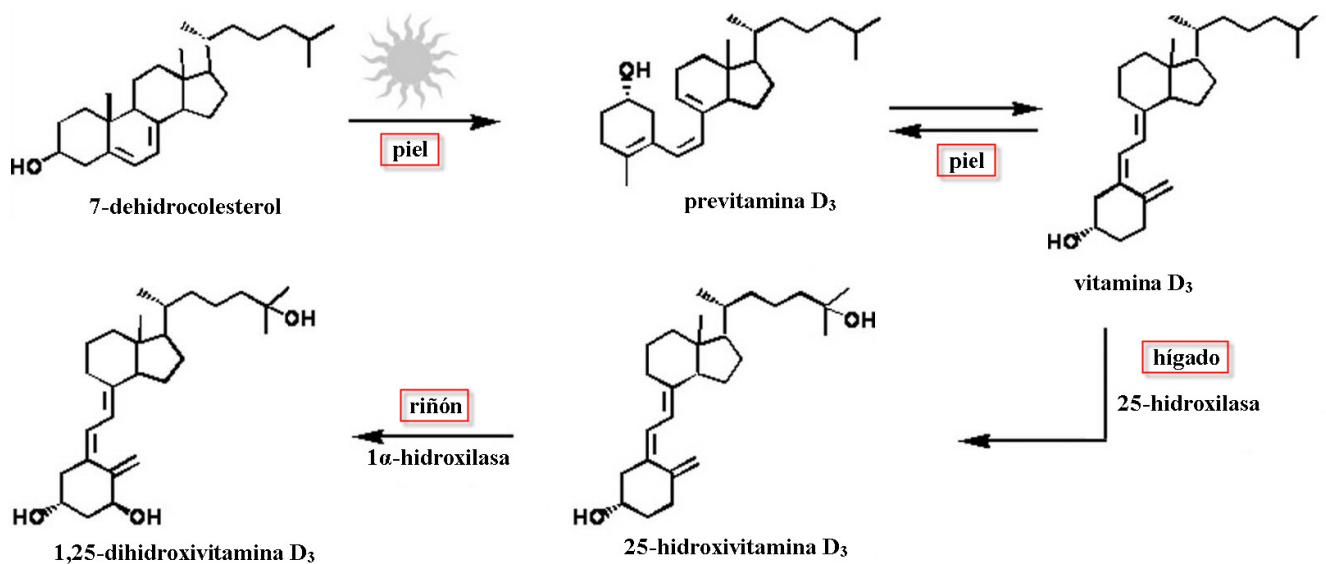


Figura 6. Síntesis de vitamina D

La vitamina D para ejercer sus efectos se une a un receptor nuclear (VDR) siendo sus principales acciones las siguientes.

- Regular los niveles de calcio y fósforo en sangre mediante el incremento de la absorción intestinal, el descenso de la reabsorción tubular y la inhibición de la secreción de PTH

- Participa en la proliferación y diferenciación celular
- Regulación de la oncogénesis
- Modula la respuesta inmune
- Participa en la secreción de hormonas peptídicas

Estos datos indican que el receptor de la vitamina D no se localiza únicamente en los órganos clásicos que regulan el metabolismo fosfocálcico sino en otras muchas células como queratinocitos, células de la médula ósea, células β -pancreáticas, cardiomiocitos, macrófagos, linfocitos y otras.

El receptor de la vitamina D se activa al unirse el agonista (1,25 dihidroxicolecalciferol) formando un heterodímero con el receptor retinoides X (RXR). Este complejo se desplaza al núcleo para unirse a los elementos de respuesta de la vitamina D. Se forma un complejo ((1,25 OH₂D-VDR-RXR) unido a DNA que regula la transcripción de diversos genes por mecanismos no claramente entendidos. Entre estos últimos son regulados negativamente genes relacionados con el metabolismo óseo (PTH y PTHrp), con genes de respuesta inflamatoria (IL2, IL12, TNF α , IFN γ , GM-CSF) y de proliferación celular (EGF-R, c-myc, K16) (22)

Acciones de la vitamina D

La vitamina D se ha denominado “ vitamina antirraquítica “, por ello las acciones clásicas de la misma están relacionadas con el sistema músculo esquelético. El efecto de la vitamina D sobre la homeostasis ósea viene determinado por el balance de calcio. En aquella situación donde el balance de calcio está equilibrado el papel de la vitamina D es redundante. Los osteoblastos poseen receptores para la vitamina D pero sus efectos viene determinados por la interacción con otras hormonas (PTH, cortisol), factores

de crecimiento (TGF β , IgF1 y otros) y señales de crecimiento como la vía Wnt o agonistas de PPAR γ . La vitamina D afecta a la proliferación de osteoblastos así como a su diferenciación y mineralización. Los osteoclastos no poseen receptores para la vitamina D pero esta puede actuar de forma indirecta a través de la liberación de RANKL por los osteoblastos. Datos de la existencia de receptores de la vitamina D en osteocitos son escasos pero, al mismo tiempo, hay que tener en cuenta que estas células son capaces de producir 1,25 dihidroxicolecalciferol. No se conoce con exactitud el papel que juega este metabolito liberado por osteocitos en la fisiología ósea. Se libera en respuesta a la carga mecánica y puede inhibir la mineralización en la laguna osteocitaria (55-57) .

La interacción entre estas células, como hemos comentado previamente, guarda relación con el balance de calcio. En situación de deficit de calcio se produce un hiperparatiroidismo secundario que va seguido de un incremento de los niveles de 1,25 dihidroxicolecalciferol, induciendo ambos la producción de RANKL por osteoblastos que incrementa la resorción ósea para tratar de normalizar la calcemia. Simultáneamente se inhibe la mineralización de la matriz ósea para facilitar el incremento de la concentración plasmática de calcio. Una vez normalizada, 1,25dihidroxicolecalciferol incrementa la expresión de CYP24A1 y FGF23 e inhibe PTH y CYP27B1. CYP24A1 degrada 1,25OH₂D₃ a 24,25OH₂D₃. CYP27B1 es inhibido por FGF23 producido por los osteocitos. A través de estos mecanismos de feed-back se regula la calcemia de forma efectiva.

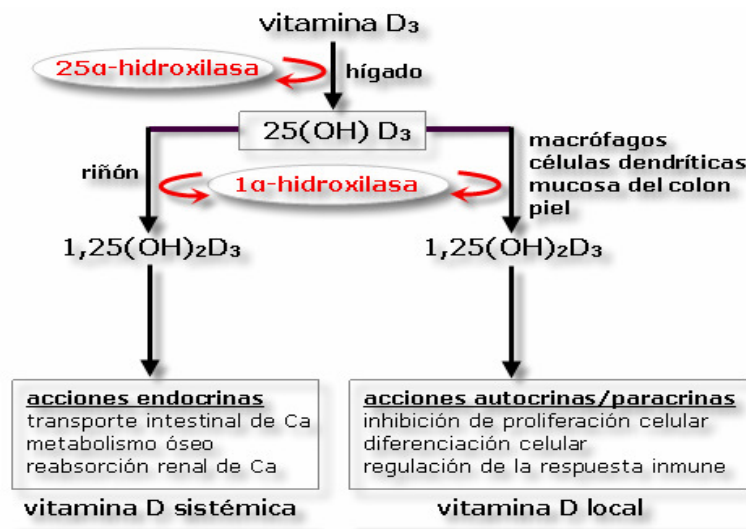


Figura 7. Acciones de la vitamina D

Niveles plasmáticos de vitamina D

Para establecer la suficiencia de los niveles de vitamina D es preciso determinar 25-hidroxicolecalciferol. Se emplea este metabolito, que tiene una actividad 100 veces inferior al metabolito activo, 1,25 dihidroxicolecalciferol, por su vida media, tres semanas, y por no estar sujeto a la actividad de otras hormonas o niveles de calcio. Existen diversos procedimientos para llevar a cabo esta medición, siendo HPLC el gold estándar aunque no es la técnica habitualmente empleada por su dificultad metodológica. Otros procedimientos como enzimoimmunoanálisis, ELISA o quimioluminiscencia, son más fácilmente aplicables en la práctica clínica (58) .

El nivel normal de vitamina D para asegura una adecuada salud ósea viene determinado por la capacidad de la vitamina D para inhibir la síntesis de PTH manteniéndola dentro de límites normales. De esta manera se evita un excesivo incremento de la resorción ósea con el consiguiente deterioro de la

cantidad y calidad ósea. De acuerdo con los niveles de 25-hidroxicolecalciferol podemos distinguir las siguientes situaciones:

- Normalidad: 25-hidroxicolecalciferol ≥ 30 ng/ml
- Insuficiencia: 25-hidroxicolecalciferol 20-30 ng/ml
- Deficiencia: 25-hidroxicolecalciferol 10-19 ng/ml
- Deficiencia severa: 25-hidroxicolecalciferol ≤ 10 ng/ml

El objetivo sería conseguir un nivel de vitamina D por encima de 20 ng/ml y , si es posible, por encima de 30 ng/ml. Sin embargo, este último valor es difícil de conseguir. Estudios epidemiológicos realizados en todas las regiones del mundo muestran que la prevalencia de hipovitaminosis D es muy elevada y, posiblemente, está volviendo a emerger como un problema de salud global (59) . En España se han realizado numerosos estudios que exponen la elevada prevalencia de este problema en todas las edades. En estudiantes y médicos en formación la prevalencia es de un 30 %. En un amplio estudio realizado en mujeres menopáusicas, la prevalencia era del 36 %. En población anciana la prevalencia puede llegar a ser del 90 %. Las tablas 1 y 2 muestran la prevalencia de osteoporosis en distintos grupos de población española

Edad	Pacientes	Método	Punto de Corte	Hipovitaminosis D	Autor
56 ±5	171	RIA	20 ng/ml	84%	Aguado et al (60)
61 ±7	161	RIA	10 ng/ml	36 %	Mezquita et al (61)
			15 ng/ml	39 %	
38 ± 11	215	HPLC	30 ng/ml	17 %	Mata et al (62)
			20-30 ng/ml	18 %	
			10-20 ng/ml	50 %	
			< 10 ng/ml	14 %	

Tabla 1. Niveles de vitamina D en población española joven

Edad	Pacientes	Método	Punto de corte	Hipovitaminosis D	Autor
77	114	HPLC	15 ng/ml	100 %	Quesada et al (63)
79±8	90	RIA	20 ng/ml	46 %	Castillo et al (64)
75±6	127	RIA	10 ng/ml	34.6 %	Gonzalez et al (65)
78±8	100	RIA	25 ng/ml	87 %	Larrosa et al (66)
68±9	326	RIA	10 ng/ml	27 %	Gomez-Alonso et al (67)
			10-18 ng/ml	40 %	
			< 25 ng/ml	33 %	
72±5	239	RIA	< 10 ng/ml	16.7 %	Vaqueiro et al (68)
			11-25 ng/ml	70.3 %	
			< 25 ng/ml	87 %	
83±7	454	HPLC	< 10 ng/ml	31%,32%,51%	Niño et al (69)
			< 20 ng/ml	79%,91%,92%	
72±2	53	HPLC	< 10 ng/ml	28%,56%	Rodriguez et al (70)
			< 20 ng/ml	80%	
82±7	49	CBP	< 10 ng/ml	47 %	Martín-Portela et al (71)
			< 20 ng/ml	90 %	

Tabla 2. Niveles de vitamina D en población española anciana

Vitamina D y fracturas

Este apartado puede abordarse de diferentes maneras, niveles de vitamina D en pacientes fracturados, efectos de suplementos sobre marcadores subrogados y efecto de suplementos sobre factores causales de fracturas, caídas y el efecto directo de la administración de vitamina D sobre la fractura.

Diversos estudios han mostrado niveles disminuidos de vitamina D asociados a fractura de cadera. Martinez et al (72) realizó un pequeño estudio incluyendo 50 individuos con fractura de cadera y 39 controles de su misma edad y sexo. Se observaron niveles disminuidos de calcidiol en los pacientes fracturados ($11,7 \pm 6.4$ vs $18,4 \pm 12.7$ nmol/l, $p < 0.05$). Un estudio de características similares fue realizado por Cauley et al (73) incluyendo 400 casos y 400 controles. Los pacientes con fractura de cadera tenían niveles inferiores de vitamina D ($55,95 \pm 20,28$ vs $56,90 \pm 18,05$ nmol/l, $p = 0,007$) de tal manera que los niveles más bajos de vitamina D incrementaba el riesgo de fractura. Resultados similares se observaron en varones con fractura de cadera (21.5 ± 7.9 vs 25.2 ± 7.8 ng/ml, $p < 0.0001$). El descenso de una desviación estándar del 25OHD se asociaba a un incremento del riesgo de fractura de cadera (OR 1.6, 95% CI 1.18-2.17) (74) . Al repetir el estudio en mujeres de diferentes etnias los resultados no eran uniformes, especialmente en mujeres de raza negra, donde niveles más elevados de vitamina D se asociaban a fracturas (75) . En un estudio con un elevado número de pacientes, 2546 mujeres postmenopáusicas, se identificaron 6 factores de riesgo relacionados con el riesgo de fractura no vertebral, uno de ellos eran los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D ($p < 0.001$) (76) .

Otros estudios han valorado el efecto de suplementos de vitamina D sobre la densidad mineral ósea (DMO). Dawson-Hughes et al (77) valoraron el efecto de los suplementos de calcio y vitamina D sobre la DMO en un estudio que incluyó 176 varones y 213 mujeres, mayores de 65 años. Se observaron incrementos de la densidad mineral ósea en cuello femoral, columna lumbar y cuerpo total. Las diferencias eran estadísticamente significativas en todas las localizaciones a un año. Sin embargo, únicamente la DMO total era significativa a los tres años. Un metanálisis que incluyó 17 estudios valoró el efecto sobre la DMO. No se observó incremento aunque hay que tener en cuenta que la dosis de vitamina D empleada era pequeña (300 o 400 UI/día) y el tamaño muestral era pequeño (78) . Sin embargo, el WHI (Women's Health Initiative) mostró un incremento de la DMO en cadera total empleando dosis de 400 UI con suplementos de calcio (79) .

Vitamina D y caídas

La caída es un factor clave en la aparición de fracturas por fragilidad. Un estudio de casos-controles, con 122 mujeres, de 12 semanas de duración mostró una reducción de caídas de un 49 % ($p=0.01$) en mujeres que recibían 800UI/día de vitamina D (80) . Los mismos autores analizaron la base de datos NHAMES III, observando una mejor fuerza muscular de las extremidades inferiores en adultos con los niveles más elevados de vitamina D (81) .

Diversos metanálisis han analizado la relación entre suplementos de vitamina D y caídas. Todos ellos han mostrado una relación favorable entre la administración de vitamina D y un descenso de la frecuencia de caídas, alrededor del 30 %. Estos descensos se producían únicamente con dosis de vitamina D entre 700 y 1000 UI / 24 h (82) .

La mejoría de la función muscular tras la administración de vitamina D tiene un doble mecanismo, directo a través de receptores de la vitamina D localizados en el músculo estriado e indirecto a través de la supresión de PTH (83) . La vitamina D ejerce una acción genómica y otra no genómica en el músculo estriado controlando las siguientes acciones:

- Regular la entrada de calcio en el retículo endoplasmático
- Regular la proliferación y diferenciación de mioblastos
- Aumentar ATA y fosfatasa intracelulares
- Aumentar la síntesis protéica muscular
- Aumentar el metabolismo fosfolipídico
- Aumentar la actividad de actina y troponina

Por otra lado, la PTH elevada ejerce un efecto perjudicial sobre el músculo provocando atrofia de las fibras musculares de tipo II, aumenta la destrucción de proteínas musculares, disminuye el oxígeno mitocondrial, la actividad ATPasa, la creatinfosfoquinasa y la oxidación de ácidos grasos musculares. La vitamina D actúa disminuyendo los niveles de PTH.

Suplementos de vitamina D y fracturas

Diversos metanálisis, incluyendo un importante número de individuos, valoran los efectos de los suplementos de vitamina D sobre fracturas. Un metanálisis que incluyó 12 estudios aleatorizados, controlados con placebo, en 42279 individuos, mostró una reducción del riesgo de fractura de cadera del 18 % y de cualquier fractura no vertebral de un 20 % (84) . Otro metanálisis que incluyó 11 estudios aleatorizados, doble ciego, con 31022 individuos, con una edad media de 76 años y analizando 1111 fracturas de cadera y 3770 fracturas no

vertebrales, se observó una reducción de fractura de cadera del 30 % y de un 11 % de fractura no vertebral. El efecto aparecía únicamente con dosis de vitamina D de 800 UI/día (Rango de 792 a 2000UI/día) (85) . The US Department of Health and Human Services (HHS) realizó un nuevo metanálisis incluyendo fracturas en varones y mujeres mayores de 50 años. Se analizaron 10 estudios aleatorizados, controlados con placebo, y 3 estudios abiertos. Participaron 58712 individuos, sin obtener resultados favorables con los suplementos de vitamina D (86) . El grupo DIPART condujo un metanálisis donde participaron 68500 personas. El punto de corte de la edad era 47 años. Se observó una reducción del riesgo total de fractura (OR 0.92, CI 0.86-0.99) y de fractura de cadera (OR 0.84, CI 0.70-1.01) que no era estadísticamente significativo (87) . En 2014 se ha realizado un nuevo metanálisis incluyendo estudios aleatorizados doble ciego y estudios abiertos, con un intervalo de tratamiento variable. La reducción de fracturas totales fue del 8 % y de un 16 % de las fracturas de cadera (88) .

Bonnen et al (89) realizaron un metanálisis que valoró únicamente el efecto sobre la fractura de cadera de suplementos de calcio y vitamina D. Fueron analizados 45509 individuos , con una reducción de fractura de cadera del 18 % (OR 0.82, CI 0.71-0.94, $p=0.0005$). La mayor parte de los estudios muestran un efecto beneficioso de los suplementos de vitamina D sobre reducción de fracturas, principalmente en fractura de cadera

La conclusión de esta revisión sobre el efecto de la vitamina D es la siguiente:

- La vitamina D es esencial para conseguir una salud ósea adecuada
- La hipovitaminosis D es frecuente en nuestra población en todos los rangos de edad
- Suplementos de vitamina D de 800 UI/día reducen caídas y fracturas

Receptor vitamina D

El receptor activo de la vitamina D ejerce su efecto a través de su unión a un receptor cuya distribución por las diferentes células del organismo es muy amplia. Se trata de un receptor nuclear que forma parte de la familia de los factores de transcripción. Su característica fundamental es su localización nuclear incluso en ausencia de ligando. Se encuentra asociado con complejos correpresores que silencia la transcripción. Como se ha comentado previamente, la unión del ligando al receptor requiere la presencia de RXR un heterodímero que se une a elementos de respuesta de la vitamina D, positivos o negativos. El heterodímero forma un complejo coactivador que permite la transactivación del gen diana por mecanismos directos e indirectos. El receptor de la vitamina D regula la expresión de genes afectados en diferentes funciones biológicas, incluyendo desarrollo de órganos, control del ciclo celular, metabolismo fosfocálcico, detoxificación, control de la inmunidad innata y adaptativa (90,91).

Su estructura consta de varias regiones (Figura 8):

- Dominio de unión a ligando localizado en la porción terminal COOH
- Región de heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR)
- Dominio de unión al DNA (Región N terminal)
- Lugar de unión a proteínas nucleares correguladoras
- Dominio de activación de la función de heterodimerización en el extremo C terminal (región de correguladores)

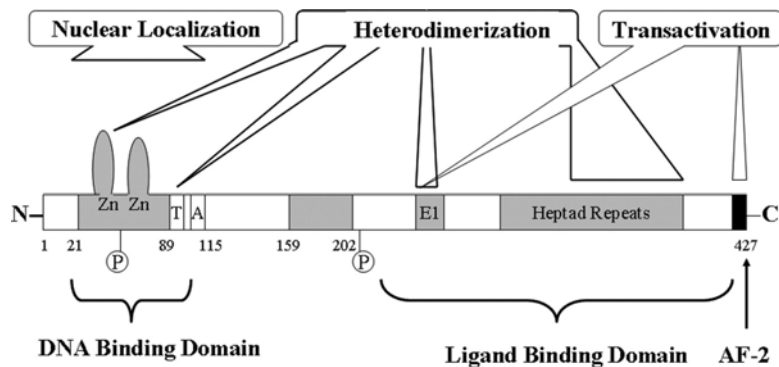


Figura 8. Receptor vitamina D (Adaptado de Dusso AJ et al. J Clin Endocrinol Metab 1991; 72: 157-164)

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 y comprende una región de aproximadamente 100 kb de DNA aunque únicamente 4.6 Kb son los que codifican la proteína. A nivel de este locus se han descrito más de 900 variantes alélicas. De todas ellas, algunas han sido asociadas a enfermedades crónicas. Mediante el empleo de diversos enzimas de restricción se han podido identificar. Las más estudiadas han sido Apal (rs7975232), Bsml (rs1544410), Taql (rs731236) y FokI (rs10735810) (92) . (Figura 9)

Estos polimorfismos producen codones silentes que incrementan la estabilidad del RNAm del receptor. La única excepción es FokI, cuyo sitio de restricción está localizado en el exon 2 de la región codificante 5'. Este polimorfismo ocasiona una proteína más corta, con 3 aminoácidos menos, que además de incrementar la estabilidad del receptor tiene una mayor actividad. La presencia de estos polimorfismos se ha asociado a numerosas enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, artritis reumatoide, cardiopatía isquémica, cancer enfermedades autoinmunes y enfermedades óseas (93-96). Estas últimas y

más concretamente la osteoporosis son las que tienen un mayor interés para nuestro estudio.

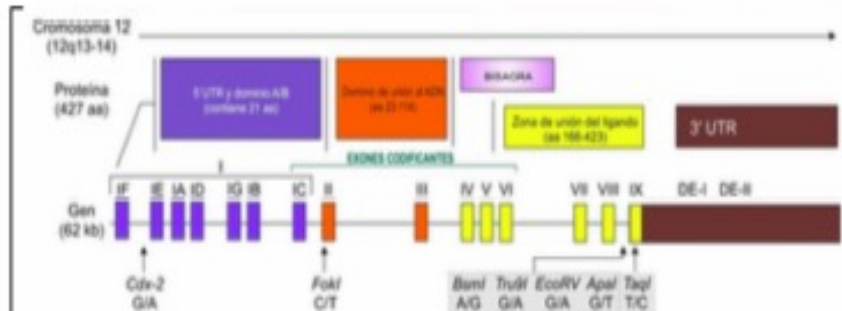


Figura 9. Localización polimorfismos receptor vitamina D (Tomado de Uitterlinden AG et al. Gene 2004; 338: 143-156)

Los diversos artículos que relacionan polimorfismos del receptor de la vitamina D y masa ósea no son concluyentes, probablemente por la heterogenicidad de la población analizada. Thakinstian et al (97) encontraron una debil asociación , estadísticamente significativa, entre el alelo B del polimorfismo BsmI y baja masa ósea lumbar. En un reciente metanálisis se encontró una relación entre polimorfismos de BsmI y ApaI y masa ósea en población asiática. BsmI mostró asociación con el riesgo de fractura de cadera pero no con TaqI (98) . Sin embargo, no todos los estudios muestran los mismos efectos (99,100) .

Regulación del receptor de vitamina D

La regulación del receptor de la vitamina D viene determinada por factores ambientales, genéticos y epigenéticos que interactúan entre si.

Los factores ambientales que regulan el receptor son la dieta, la exposición solar, la edad, la polución y procesos infecciosos. Estos factores ambientales actuarían modificando los niveles de vitamina D que regulan el receptor. No se conoce el mecanismo pero se sospecha que modifica la cromatina nuclear a través de cambios de histonas y metilación o demetilación de DNA, en conjunción con correpresores y coactivadores. Otros factores que intervienen son la adquisición del precursor de la vitamina D así como la producción y la actividad del ligando. Un tercer mecanismo sería la estabilización de la proteína del receptor a través de su ligando (101) .

El impacto de estos factores ambientales es mediado por mecanismos epigenéticos y modulado por mecanismos genéticos. Dos GWAS (Genome-Wide association study) analizaron diversos genes que guardan relación con los niveles circulantes de vitamina D. Estos polimorfismos eran rs1790349 y rs127858878 (relacionados con la síntesis de colesterol); rs2060793 y rs10741657 (relacionados con CYP11A1); rs6013897 (relacionados con CYP24A1); rs2282679,rs7041,rs1155563 (relacionados con el transporte de la vitamina D). No se ha encontrado relación de ninguno de los polimorfismos del receptor de la vitamina D con los niveles de vitamina D aunque estos polimorfismos pudiera influir sobre la expresión y función del receptor. Únicamente en población diabética se han observado diferentes niveles de vitamina D como respuesta a los suplementos en función del polimorfismo FokI (rs2228570). Los pacientes ff presentan niveles más bajos de vitamina D que los pacientes FF, siendo la diferencia estadísticamente significativa (102,103) .

La regulación de la función genética por mecanismos epigenéticos puede producirse en cuatro niveles, metilación DNA, cambios de histona, RNA codificante, variación en proteínas “ holding “ mediada por prion (101) .

ISOFLAVONAS

La soja es una excelente fuente de proteínas biológicamente valiosa, con bajos niveles de grasas saturadas, un alto contenido de fibra dietética y una característica única, un alto contenido en isoflavonas, todos los cuales son factores clave en los beneficios que la soja tiene sobre el esqueleto (104) .

Las isoflavonas son sustancias no nutritivos que tienen un efecto beneficioso sobre la salud (105) . Ellas son una subclase de flavonoides y su estructura química se compone de un núcleo de flavona formada por dos anillos de benceno unidos por un pirano heterocíclico. Los principales isoflavonas presentes en la soja son genisteína y daidzeína, junto con una pequeña cantidad de gliceteína (106) . Las isoflavonas están presentes en la soja como glucósidos, pero se convierten en agliconas después de la fermentación por hidrólisis bacteriana. Aunque hay un pico en suero pequeño, después de una o dos horas, el pico máximo en suero se alcanza 4-6 horas después de la ingesta. La vida media es de 4-8 horas y todas las isoflavonas se excretan en 24 horas. Sólo de un 30 a un 50% de las personas puede metabolizar la daidzeína en isoflavandiol, equol, que desempeña un papel clave en la respuesta clínica (107) .

Mecanismo de acción de las isoflavonas en el esqueleto

La osteoporosis resulta de alteraciones en el hueso que causan un desequilibrio entre la formación ósea y la resorción, con un predominio de la resorción resultando en una reducción de la resistencia ósea y la aparición de fracturas (28) siendo un elemento clave es la caída de estrógenos (108, 109) . Las isoflavonas se unen a los receptores estrogénicos para desencadenar una

serie de acciones que determinan su efecto beneficioso sobre el esqueleto (Figura 10).

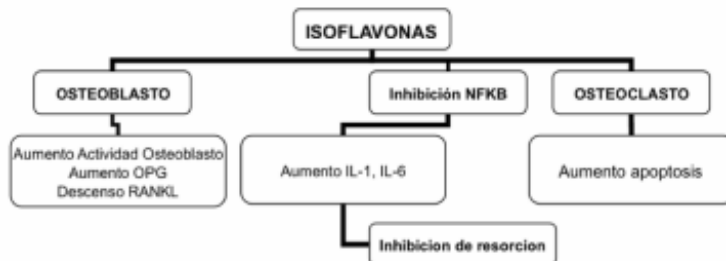


Figura 10. Isoflavonas y hueso (Modificado de Pérez-Castrillón JL et al. Cur Wom Health Rev 2009; 5: 125-129)

Las isoflavonas se comportan como moduladores de los receptores estrogénicos y pueden actuar como agonistas, agonistas parciales o antagonistas. El efecto mediado a través de su enlace con el receptor, predominantemente el receptor β , es un efecto genómico. Se forma un complejo con el receptor que interactúa con el ADN nuclear modificando la síntesis de proteínas (110) . En estudios in vitro con células MC3T3-E1, de origen osteoblástico, la daidzeína incrementa la actividad de los osteoblastos, que se expresa por un aumento de actividad de la fosfatasa alcalina, síntesis de ADN y mayor concentración de fosfatasa alcalina en el sobrenadante (111) . Por otro lado, la genisteína aumenta la producción de OPG por los osteoblastos e inhibe la actividad de NF- κ B, reduce la síntesis de IL-6, una citocina que aumenta la resorción ósea (112) . A través de este mecanismo, las isoflavonas son capaces de modular la vía metabólica RANK / RANKL / OPG . Crisafulli et al (113) encontraron que la genisteína inhibe la producción de RANKL y aumenta la de osteoprotegerina relacionándose con los cambios en la

masa ósea y con un marcador de la resorción, desoxipiridinolina, en las mujeres posmenopáusicas sanas. El efecto era diferente del producido por los estrógenos, que disminuyeron los niveles tanto de RANKL como de OPG.

Además, las isoflavonas ejercen otros efectos no mediados por genes ni receptores, más rápidos, a través de la modificación de las vías metabólicas intracelulares tales como la proteína-tirosina-quinasa, fosfolipasa C y proteinquinasa activada por mitógenos (MAPK). Algunas de estas enzimas son necesarias para la activación de los osteoclastos, y su inhibición produce un aumento en la apoptosis de estas células. Sin embargo, para ejercer este efecto, debe haber al menos un nivel mínimo de estrógenos circulantes (114) .

Otros posibles efectos beneficiosos de las isoflavonas son el incremento de la expresión del receptor de la vitamina D, lo que facilita la absorción intestinal de calcio y la mineralización, la reducción de la angiogénesis, un efecto antioxidante y la inhibición de la actividad del enzima aromatasa (110, 114-117) .

El posible beneficio de las isoflavonas en la prevención y tratamiento de la osteoporosis viene determinado por el aumento de actividad de los osteoblastos asociado con una reducción en la resorción ósea mediada por los osteoclastos, que modifica el desequilibrio entre la formación ósea y la resorción que es responsable de la osteoporosis postmenopáusica.

Estudios clínicos

El interés en los posibles efectos beneficiosos de la soja en el tratamiento de la osteoporosis se originó en la menor tasa de fracturas en los países asiáticos con una alta ingesta dietética de soja. Sin embargo, hay otros factores dietéticos independientes que también pueden explicar estas diferencias. El papel

terapéutico de las isoflavonas se ha analizado en los estudios observacionales y de intervención.

La revisión de Mesina et al (118) incluyó 10 estudios observacionales, 9 transversales y un estudio prospectivo. Los estudios fueron heterogéneos con respecto al tamaño de la muestra y la edad de la población analizada . La masa ósea se midió a nivel sitios central y periférico y las dietas de isoflavonas eran variables. La mayoría de estos estudios mostraron una asociación positiva entre el consumo de soja y la masa ósea. En los que no encontró ningún efecto, se midió la densidad mineral ósea (DMO) en el calcáneo por ecografía, lo que confirma que las isoflavonas no actúan en esta localización. Un estudio prospectivo de 116 mujeres premenopáusicas encontró que la pérdida ósea en la columna lumbar fue estadísticamente superior en el cuartil con la ingesta de soja más bajo (3,5%) que en el cuartil con mayor consumo (1,1%) ($p = 0,05$) (119) .

El perimenopausal Women Study Osteoporosis de Hong Kong (HKPOST) analizó los factores que determinan la pérdida de masa ósea durante el período de la perimenopausia y la menopausia precoz en un grupo de 438 mujeres chinas seguidas durante 30 meses, 173 mujeres perdieron masa ósea y 236 no lo hicieron. El primer grupo tuvo un consumo de soja significativamente menor; $3,7 \pm 3,88$ frente a $5,2 \pm 6,19$, respectivamente ($p < 0,01$) (120) .

Mesina et al (118) analizaron 15 estudios que evaluaron el impacto de la soja, la proteína aislada de la soja o las isoflavonas, sobre la masa ósea en la postmenopausia o en mujeres perimenopáusicas. El tamaño de la muestra era pequeña, incluyendo menos de 100 sujetos todos los estudios, con un período de seguimiento que osciló entre 6 y 24 meses. Sólo cuatro estudios no encontraron ningún efecto beneficioso. Los resultados sugieren que el

consumo de altas dosis de flavonoides por jóvenes mujeres postmenopáusicas fue beneficioso.

Sin embargo la mayoría de estos ensayos carecían del rigor metodológico necesario para proporcionar resultados concluyentes. La mejor evidencia científica proviene de ensayos clínicos aleatorizados con un tamaño de muestra adecuado y de los meta-análisis de este tipo de estudios .

En 2008, Ma DF et al (121) publicaron un metanálisis de 10 estudios que incluía 608 pacientes. Los resultados mostraron un efecto beneficioso de isoflavonas en una dosis > 90 mg / 24 h, observando los beneficios después de 6 meses. Liu et al (122) valoraron, en su metanálisis , estudios controlados con un periodo de intervención mínimo de un año. Se incluyeron 10 estudios con 896 mujeres con una ingesta media de soja de 87 mg/día. Se observó un incremento de la masa ósea en columna lumbar del 0,4 % y del 0,2 % en cuello femoral pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Alexandersen et al (123) analizaron el efecto de la ipriflavona, un derivado sintético de la daidzeína, en las mujeres europeas con un alto porcentaje de la osteoporosis (71,6%). Un total de 234 mujeres post-menopáusicas se incluyeron en el grupo de tratamiento y 240 en el grupo de placebo. Los objetivos primarios fueron los cambios en la masa ósea y marcadores del remodelado a los 36 meses, aunque también se analizaron las fracturas vertebrales. No se encontraron diferencias en los resultados entre los dos grupos y el estudio concluyó que la ipriflavona no tuvo ningún efecto en esta población.

Morabito et al (124) realizaron un estudio aleatorizado, controlado con placebo en 90 mujeres post-menopáusicas de edad 47 a 57 años, que fueron divididos en tres grupos; placebo, estradiol y genisteína (57 mg / 24 h). La masa

ósea en la columna lumbar y la cadera aumentó significativamente en los grupos de estradiol y la genisteína. En este grupo, se analizó el efecto de la genisteína sobre el sistema RANKL / OPG.

Marini et al (125) llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado controlado con placebo para evaluar el efecto de la genisteína. El estudio duró 24 meses e incluyó 190 mujeres con osteopenia en cada grupo. El objetivo primario fueron los cambios en la DMO lumbar. Se observó un aumento significativo en masa ósea lumbar y femoral en pacientes tratados. También hubo una reducción en los marcadores de resorción ósea (desoxipiridinolina urinaria) y un incremento en marcadores de formación (fosfatasa alcalina ósea) sin cambios en el grosor endometrial. No se analizaron fracturas.

Diferentes resultados fueron encontrados por el grupo Phytos (126) , que estudió una dieta enriquecida en isoflavonas con un consumo promedio de 110 mg / 24 horas. Cada grupo incluyó a 150 pacientes, de los cuales 237 completaron el estudio. Los objetivos primarios fueron los cambios en la masa ósea y marcadores del remodelado a los 12 meses. No hubo diferencias entre los grupos de placebo y de intervención, a pesar de las altas tasas de adherencia. Los efectos adversos, como en el estudio anterior, fueron similares entre ambos grupos.

Sólo un estudio ha evaluado el efecto de las isoflavonas en la reducción de fracturas, Shanghai Health Study (127), que incluyó una cohorte de mujeres posmenopáusicas de 40 a 70 años con un alto consumo de soja, que fueron seguidos durante 54 meses. La cohorte incluyó 75.000 mujeres y encontró una reducción en el riesgo de fractura del 48% dentro de los 10 años de la menopausia y el 39% en las mujeres con una evolución más larga. El efecto se observó en el quintil de las mujeres con la mayor ingesta después de ajustar

por edad, factores de riesgo de osteoporosis, factores dietéticos y el nivel socioeconómico.

Diversos metanálisis han tratado de valorar el efecto de las isoflavonas sobre marcadores del remodelado óseo y densidad mineral ósea. Ma et al (128) analizaron 432 individuos procedentes de 9 estudios. Se estudió la deoxipiridinolina como marcador de resorción y la fosfatasa alcalina ósea como marcador de formación. Se observó un descenso de la deoxipiridinolina en las consumidoras de isoflavona, -2.08 nmol/mmol (IC $-3.82, -0,34 \text{ nmol/mmol}$) . La fosfatasa alcalina ósea se incrementó $1.48 \text{ } \mu\text{g/l}$ (IC $0.22-2,75 \text{ } \mu\text{g/l}$) pero sin ser estadísticamente significativo. El efecto era superior con dosis de isoflavona inferiores a 90 mg/día y menos de 12 semanas de tiempo de administración. El metanálisis demostró un perfil beneficioso de las isoflavonas , inhibiendo los marcadores de resorción. Taku et al (129) publicaron un metanálisis más completo, con 10 estudios y 887 individuos. Se emplearon como marcadores deoxipiridinolina urinaria, fosfatasa alcalina ósea y osteocalcina. Los resultados eran similares a los previos. La ingestión diaria de 56 mg de isoflavonas durante periodos de 10 semanas a 12 meses produjo un descenso de deoxipiridinolina de un 14% , estadísticamente significativo. No se observaron cambios en otros marcadores. . La conclusión de ambos metanálisis fue que el efecto de las isoflavonas era mayor sobre marcadores de resorción aunque con valores inferiores a los obtenidos con estrógenos y otros fármacos más potentes.

Varios metanálisis han valorado el efecto de las isoflavonas sobre la densidad mineral ósea. Los resultados no son uniformes dependiendo de los estudios seleccionados, tiempo de administración, tipo de suplementos y periodo de seguimiento. Ma et al (130) analizaron 608 individuos en 10 estudios, controlados con placebo. Encontraron un incremento estadísticamente

significativo de la densidad mineral ósea en columna lumbar de 20.6 mg/cm^2 (IC $4,5\text{-}36,6 \text{ mg/cm}^2$) y del contenido mineral óseo 0.93 (IC $0,37\text{-}2,24 \text{ mg}$) sin ser estadísticamente significativo. El efecto se apreciaba con dosis superiores a 90 mg/día y periodos de tratamiento superiores a 6 meses. Liu et al (131) analizaron 896 mujeres , procedentes de 10 estudios, con periodos de seguimiento de al menos 1 año y con una dosis media de 87 mg . Los cambios de DMO en columna lumbar, cuello femoral y cadera total no eran significativos. Los resultados no variaron al analizar diversos subgrupos que tenían en cuenta la dosis, tipo de isoflavona y raza.

Tuku et al (132) analizaron 1240 mujeres procedentes de 12 estudios randomizados donde se valoraba el efecto de extractos de isoflavona sobre la DMO en columna lumbar. Los autores observaron que la ingesta de 82 mg /24 h , durante un mínimo de 6 meses, incrementaba la DMO un $2,8 \%$, siendo los resultados robustos. No se observaron efectos en cuello femoral y cadera total. Se observaron diferencias en función de la duración de la intervención, de la raza y de la DMO basal. Ricci et al (133) en nuevo metanálisis con 1433 mujeres no encontraron diferencias densitométricas. Wei et al (134) en 2012 han publicado un nuevo metanálisis con 19 estudios. Se valoró el efecto de los suplementos sobre marcadores del remodelado y DMO. Las isoflavonas incrementaban la DMO en columna lumbar y disminuía la deoxipidinolina urinaria en un 23% .

En conclusión, la evidencia sugiere que las isoflavonas, especialmente genisteína, pueden tener un efecto beneficioso sobre la masa ósea. El efecto es mayor en la columna lumbar, donde el hueso trabecular es metabólicamente más activo y tiene un mayor grado de remodelado. El efecto se produce en mujeres postmenopáusicas, especialmente dentro de los 10 años después de la

menopausia y, eventualmente, a una dosis mayor de 90 mg / 24 h. Sin embargo, son necesarios estudios más amplios en los diferentes grupos étnicos para determinar la posible utilidad clínica de estas sustancias.

SINERGIA VITAMINA D-ISOFLAVONAS

Hay datos en la literatura, previamente comentados, que muestran el beneficio de la administración de isoflavonas y vitamina D sobre la salud ósea. No hay estudios que muestren un efecto sinérgico de la administración conjunta de estas dos sustancias aunque teóricamente es posible. Estudios in vitro han mostrado que las isoflavonas aumentan la expresión de receptores de vitamina D en la superficie celular con lo que se podría potenciar la acción de la vitamina D (135) . Por otra parte, la administración conjunta de vitamina D e isoflavonas aumenta la concentración plasmática máxima de estas últimas con lo que podría conseguirse un mayor efecto. Por tanto, estos datos sugieren que posiblemente pueda existir un efecto sinérgico de ambos elementos que podría potenciar la acción individual de cada uno de ellos (136) .

Otros efectos descritos in vitro que podría explicar la sinergia entre ambas sustancias serían que las isoflavonas podrían:

- Inhibir el enzima CYP24 que interviene en la degradación del 1,25 dihidroxicolecalciferol y de su precursor 25-hidroxicolecalciferol lo que incrementaría los niveles plasmáticos de los mismos (137) .
- Estimular el enzima CYP27B1 que interviene en la síntesis de 1,25 dihidroxicolecalciferol (138) .
- Bloqueo de la prostaglandina E2 (139) . El papel de las prostaglandinas en el metabolismo óseo no está claramente establecido pudiendo tener un efecto dual, perjudicial y beneficioso. Se ha observado que esta prostaglandina es capaz de incrementar la resorción ósea actuando sobre los osteoblastos e incrementado la producción de RANKL (140) (Figura 11)

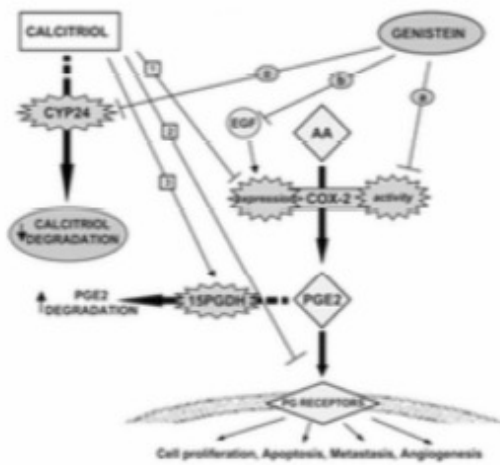


Figura 11. Sinergia Vitamina D-Genisteína (Tomado de Park CY et al. Nutrients 2012; 4: 1610-1621)

HIPÓTESIS

HIPOTESIS

El incremento de los niveles de vitamina D, bien por efecto de la radiación ultravioleta bien por suplementos, inhibiría el remodelado óseo en mujeres con menopausia reciente pudiendo ser el efecto potenciado por la asociación de isoflavonas y ser modulado por polimorfismos genéticos del receptor de la vitamina D

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Valorar el efecto de tres procedimientos (radiación ultravioleta, calcio y vitamina D y calcio, vitamina D y genisteína) sobre marcadores de resorción ósea (CTX) y formación ósea (P1NP) tras doce semanas de tratamiento

Objetivo primario

Descenso de CTX y cambios en P1NP tras doce semanas de tratamiento

Objetivos secundarios

- Cambios en P1NP , PTHi, 25-hidroxicolecalciferol
- Determinar la prevalencia de hipovitaminosis D en esta población
- Valorar los cambios del remodelado óseo en función de los genotipos y haplotipos del receptor de vitamina D

MÉTODOS

Población de estudio

La población estudiada estaba constituida por mujeres postmenopáusicas sanas. El tamaño muestral será de 50 pacientes por grupo. Este tamaño se ha calculado teniendo en cuenta unas posibles pérdidas de un 15 % y para obtener un descenso del remodelado óseo de un 30 % con respecto al placebo. Un metanálisis recientemente publicado (129) muestra que las isoflavonas disminuyen el remodelado óseo un 18 %, la asociación de calcio y vitamina D podría tener un efecto sinérgico incrementando este descenso del remodelado a un 30 %. De acuerdo con estos datos un tamaño muestral de 47 casos nos permitiría observar diferencias estadísticamente significativas

Criterios de inclusión

Mujeres postmenopáusicas, con ausencia de reglas durante el último año y con menos de 10 años desde la menopausia, sanas.

Criterios de exclusión

- Pacientes diagnosticadas de osteoporosis y aquellas que estén tomando fármacos que modifiquen el metabolismo óseo
- Pacientes con fracturas clínicas previas por fragilidad
- Pacientes con litiasis renal
- Pacientes con hiperparatiroidismo primario
- Pacientes con enfermedad tiroidea
- Pacientes VIH
- Pacientes con neoplasias de menos de 5 años

- Pacientes que tengan en la historia evidencia de enfermedades, medicaciones, alteraciones analíticas u otra circunstancia que pueda alterar el desarrollo del estudio

MÉTODOS

A todas las pacientes, en la visita inicial, se les realizó una historia clínica sistematizada (Anexo 1).

Las pacientes una vez confirmado que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, tras firmar el consentimiento informado (Anexos 2 y 3) fueron fueron aleatorizadas, por un sistema informático, a tres grupos A (placebo), B (calcio-vitamina D, 1000mg de calcio y 800 UI vitamina D) y C (calcio-vitamina D-isoflavona, 1000mg de calcio y 800 UI vitamina D y 90 mg de genisteína) siendo el estudio doble ciego y controlado por placebo. Tras las primeras visitas se realizó una final a las 12 semanas, para determinar la respuesta y presencia de efectos adversos. El cumplimiento terapéutico se midió por el test de Morinsky-Green (Anexo 4) (141) .En la visita inicial y final se realizó una analítica realizándose el estudio genético en la visita inicial

Analíticas

Se extrajo sangre, tras ayunas de 12 horas, en la consulta en el periodo comprendido entre las 9 y las 12 horas. Se realizarán extracciones en las visitas 1 y 3. Se envió la muestra al laboratorio del hospital universitario Río Hortega para la analítica básica. El suero del paciente se alicuotó en tubos de 1 ml (3 por paciente). Se envió una muestra al laboratorio de Metabolismo del Calcio del Hospital Marques de Valdecilla para realizar las

siguientes determinaciones : CTX, PINP, PTHi y 25-vitamina D y se guardó sangre total en un tubo con EDTA para el estudio genético.

Analítica básica

- Determinación de calcio, fósforo, colesterol total, colesterol-LDL, Colesterol-HDL mediante un autoanalizador (Technicon Dax autoanalyser, Technicon Instruments, CO.USA).

Marcadores de remodelado y hormonas reguladoras de calcemia

- P1NP,
- beta-CTX
- 25-OH-Vitamina D
- PTHi

La determinación se realizó mediante un método semiautomizado de electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, GMBH, Manhein, Alemania). El P1NP tenía un límite de detección de 5 ng/ml (rango de referencia 20-76 ng/ml) y el coeficiente de variación intraensayo e interensayo eran de 3,5 % y 3,5 % (142) . El coeficiente de variación intraensayo e interensayo para β -CTX era de 4,2 % y 4,7 % respectivamente y el límite de detección era de 0,01 ng/ml (143) . El límite de detección de vitamina D era 4 ng/ml, su coeficiente de variación intraensayo era del 5 % y de interensayo era del 8,5 %. Con respecto a la PTHi, su límite de detección era de 6 pg/ml, con un rango de 15-65 pg/ml. El coeficiente de variación intraensayo e interensayo eran de 5,4% y 5,9% respectivamente (143) .

Estudio genético. Tecnología iPLEX GOLD Sequenom

Por las características de la química y el sistema de detección con MALDI-TOF se pueden analizar variaciones de una única base, ya sean cambios de dos alelos o más, e inserciones y deleciones de hasta 40 pares de bases. Para el diseño se utiliza el software Assay Design v4.

El primer paso del proceso de genotipado es amplificar mediante una PCR convencional la región donde está el SNP, para cada variante se diseñan dos cebadores de PCR que amplifican una región de unos 100 pares de bases. Las reacciones no son individuales si no que en cada una podemos analizar simultáneamente entre 1 y 36 SNPs, reacciones *multiplex*, gracias al diseño de cebadores de PCR compatibles. Tras esta amplificación se realiza una purificación con el enzima SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) para eliminar los dNTPs empleados en el paso anterior. A continuación se realiza la reacción de extensión SBE(*single base extension*); se diseña un tercer cebador por variante, que hibrida adyacente a la base polimórfica y se añade a este cebador la base complementaria al SNP en 3'. En este paso cada cebador incrementa su longitud un nucleótido, lo que implica un cambio en la masa del cebador; esto nos permite identificar mediante espectrometría de masas qué nucleótido se ha incorporado.

Posteriormente se preparan estos productos de extensión para la espectrometría de masas, para ello se incorpora una resina de intercambio catiónico que va a eliminar todas las sales presentes, principalmente el Na⁺ y el

K^+ , ya que generan artefactos en los espectros, y se añade agua desionizada. Los productos finales se transfieren mediante el robot RS1000 a un chip, que tiene 384 posiciones con la matriz, ácido 3-HPA, el volumen que se puntea en cada punto con matriz es de 15 nL. Estos chips se leen en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, MA4 de Sequenom. Un laser ultravioleta, con una longitud de onda de 337nm, irradia cada punto transfiriendo energía, lo que genera una nube de iones que es acelerada a través de un campo eléctrico, posteriormente los iones se dirigen hacia el detector en una zona libre de carga. El ratio m/z se calcula partir del tiempo de vuelo y se obtiene un espectro de masas para cada reacción *multiplex*, empleando el *software* SpectroAcquire. Para cada SNV tenemos tres posibles picos, uno correspondiente al cebador de extensión en aquellos casos donde no haya funcionado la reacción, otro si el cebador se ha extendido para el nucleótido de menor masa y el tercero si el cebador ha incorporado el nucleótido de masa mayor (Buetow KH 2001). Los espectros son revisados manualmente empleando el *software* Typer Analyzer v4.

Genotipificación de 3 SNPs se llevó a cabo por el CEGEN utilizando la plataforma de Sequenom iPlex[®] MassARRAY, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sequenom, San Diego, CA). Genotipificación fueron diseñados utilizando el software Sequenom MassARRAY Ensayo Designer 4.0. 11 SNPs se genotipo en 1 ensayo, las reacciones de PCR se establecieron en un volumen de 5 l y contenía 20 ng de ADN molde, 1,25 x tampón de PCR, 1,625 mM $MgCl_2$, 500 mM dNTPs y 1 U / reacción del HotStar polimerasa Taq (Roche) . Un grupo de cebadores de PCR (Metabion) se hizo a una concentración final de cada cebador de 100 nM. Las condiciones de ciclado térmico para la reacción consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94 ° C durante 15 minutos, seguido por 45 ciclos de 94 ° C durante 20 segundos, 56 ° C durante 30

segundos y 72 ° C durante 1 minuto, seguido por una etapa de extensión final de 72 ° C durante 3 minutos. Los productos de PCR se trataron con 0,5 U de fosfatasa alcalina de camarón por incubación a 37 ° C durante 40 min, seguido de la inactivación de la enzima por calentamiento a 85 ° C durante 5 min para neutralizar dNTPs no incorporados.

Las reacciones ORO IPLEX se establecieron en un 9 l de volumen final y contenían 0.222x IPLEX búfer Plus, mezcla terminación 1x IPLEX y 1x IPLEX enzima. Una mezcla de cebador de extensión (Metabion) se hizo para dar una concentración final de cada cebador entre 0,84 M y 1,25 M. Las condiciones de ciclado térmico para la reacción incluyen un paso inicial de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, seguido por 40 ciclos de 94 ° C durante 5 segundos, con un bucle interno 5 ciclos a 52 ° C durante 5 segundos y 80 ° C durante 5 segundos, seguido por un paso de extensión final de 72 ° C durante 3 minutos. El siguiente paso es para desalar los productos de reacción de oro IPLEX con resina Clean siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos desaladas se dispensaron en un 384 SpectroCHIP II utilizando un Nanodispenser RS1000 y espectros fueron adquiridos utilizando el espectrómetro de masas MA4, seguido por la inspección manual de los espectros por personal capacitado utilizando el software MassARRAY Typer, versión 4.0. Todos los ensayos se realizaron en placas de 384 pocillos, incluidos los controles negativos y un trío de muestras Coriell (Na10830, Na10831 y Na12147) para el control de calidad.

Se analizaron los siguientes SNPs empleando los siguientes pares de primers:

1. **rs1544410:**

ACGTTGGATGAGAGCAGAGCCTGAGTATTG
ACGTTGGATGGAGGAACTAGATAAGCAGGG

2. **rs731236:**

ACGTTGGATGTTCTTCTCTATCCCCGTGCC
ACGTTGGATGTGTACGTCTGCAGTGTGTTG

3. **rs7975232:**

ACGTTGGATGTGCCGTTGAGTGTCTGTGTG
ACGTTGGATGTAGAGAAGAAGGCACAGGAG

Determinación de Haplotipos

La estimación de haplotipos se realizó a partir de los haplotipos inferidos mediante el uso del software PHASE (http://depos.washington.edu/ventures/UW_Technology/Express_Licenses/Phasev2.php) (144). Phase realiza una inferencia de haplotipos siguiendo un sistema de aproximación bayesiano que incorpora una información inicial observada que servirá como guía para realizar las estimaciones de haplotipos no observados previamente en la población. Se utilizó el archivo “out-pair” de phase que contiene asignación de pares de haplotipos para cada individuo con su probabilidad correspondiente

Estudio estadístico

El tamaño muestral era de 50 participantes por grupo. Este tamaño se ha calculado teniendo en cuenta unas posibles pérdidas de un 15 % y para obtener un descenso del remodelado óseo de un 30 % con respecto al placebo.

La base de datos y el análisis de los mismos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS v.15.0 con licencia oficial de la Universidad de Valladolid. Las variables continuas se describieron como media \pm DS (distribución normal), mientras que las cualitativas lo fueron mediante frecuencias y porcentajes.

El test de Kolmogorov–Smirnov se usará para determinar la normalidad de las distribuciones. Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi cuadrado con test exacto de Fisher o razón de verosimilitud cuando las condiciones lo requirieron. Para estudiar las diferencias entre medias se utilizaron los tests estadísticos paramétricos y no paramétricos exigidos por las condiciones de aplicación (t de Student, U de Mann-Whitney, ANOVA con prueba post-hoc de Bonferroni, H de Kruskal-Wallis). El nivel de significación se considerará para una $p \leq 0.05$.

El análisis se realizó por protocolo pero como la adherencia fue muy elevada los resultados por protocolo y por intención de tratar fueron similares

Aspectos éticos

El trabajo fue aprobado por el Comité de Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Río Hortega y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de iniciar el estudio (Anexo 2,3, 5)

RESULTADOS

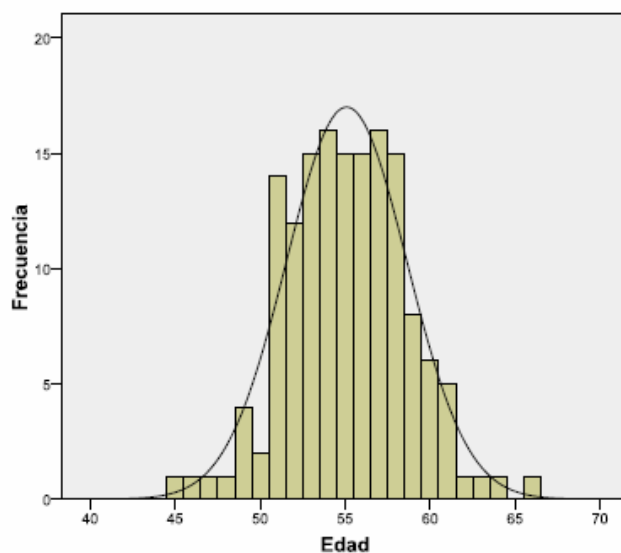
RESULTADOS

Se incluyeron 151 pacientes derivados desde distintos centros de Salud del área oeste de Valladolid.

Edad

La edad media de los pacientes fue de 55 años con una desviación estándar de 35 años. El rango se extendía entre 45 y 66 años con una mediana de 55 años.

En la Figura 12 podemos apreciar la distribución de las edades



DISTRIBUCIÓN NORMAL

Figura 12. Distribución de la edad de la población estudiada

Datos Ginecológicos

Todas las mujeres eran postmenopáusicas, criterio de inclusión, de las que 132 (87 %) tuvieron una menopausia natural y 19 (13 %) una menopausia quirúrgica. La edad media de la menopausia fue de 49 años con una desviación estándar de 3,8 años. El rango de edad variaba entre 37 y 57 años. La mediana fue de 50 años. La menarquia ocurrió a los 13 años con una desviación estándar de 1,2 años, un rango de 9 a 16 años y una mediana de 13 años.

La media de hijos fue de 1,79 por mujer con una desviación estandar de 0,8. El rango osciló entre 0 y 4 siendo la mediana de 2 hijos. La mujeres que realizaron lactancia fue de 114 (75 %) con una media de 7,8 meses y una desviación estandar de 7,3 siendo el rango de lactancia entre 1 y 60 meses.

Las figuras muestran la distribución de las edades de menopausia, menarquia y de los meses de lactancia (Figura 13,14 y 15)

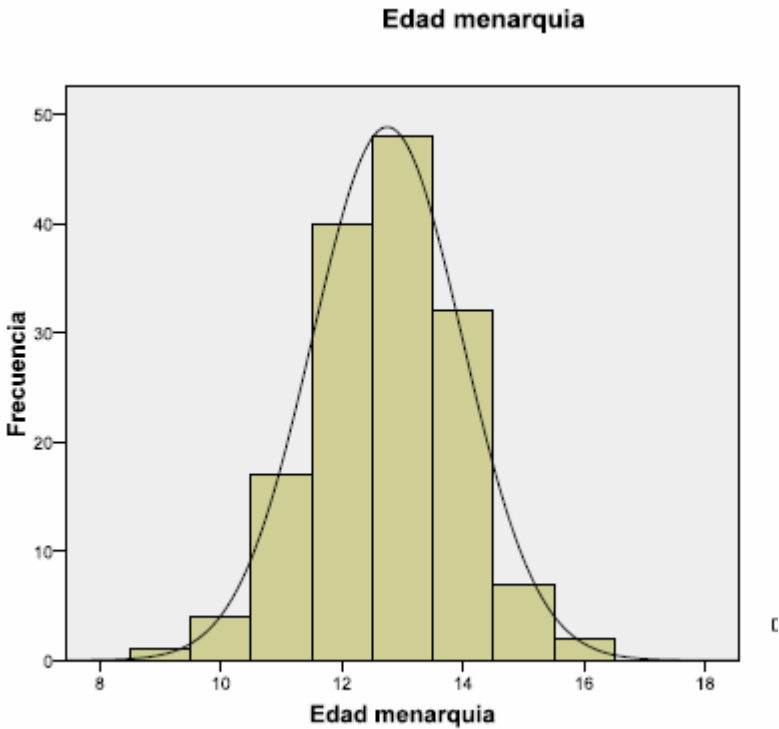


Figura 13. Edad de menarquia

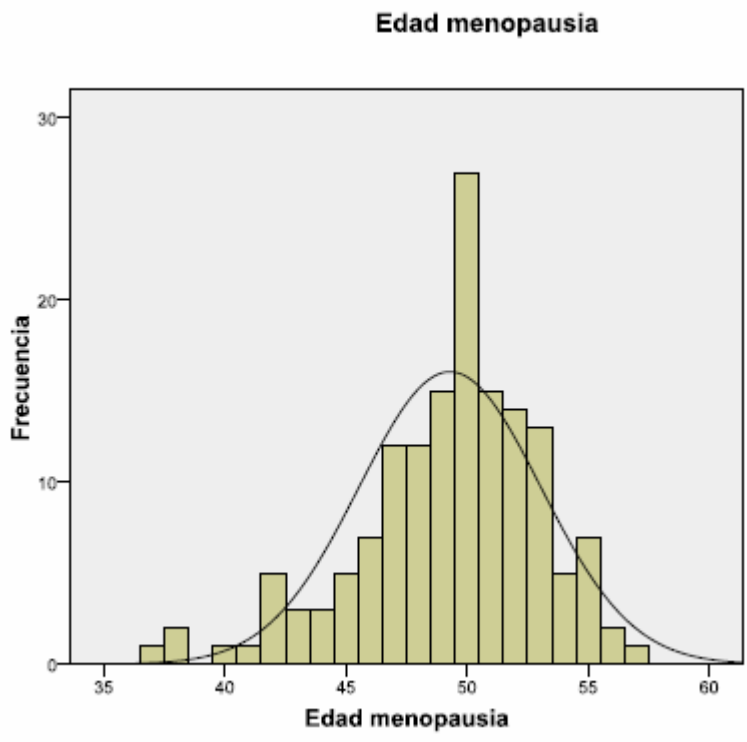


Figura 14. Edad de menopausia

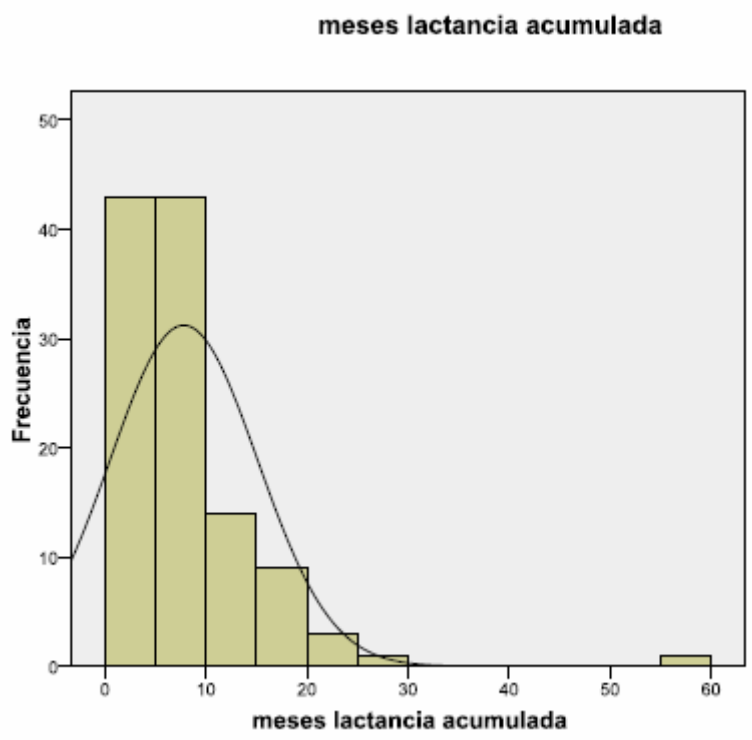


Figura 15. Meses de lactancia acumulada

Hábitos

Un total de 46 mujeres (30,5 %) eran fumadoras activas, 76 mujeres (50 %) no fumadoras y 29 (19,2 %) exfumadoras. La media de consumo de cigarrillos de las fumadoras fue de 11 con una desviación estandar de 7. La mayor parte no consumía alcohol, 141 (93 %) mientras que 10 (6 %) ingería alcohol aunque en cantidad pequeña, un total de 7 gr/día con una desviación estandar de 2,6 gr y un rango de 5 a 10 gr/día. La ingesta de café se observó en 111 mujeres (73 %) con una media de 2 tazas/día. Realizaban ejercicio un importante número de mujeres, 30 (20 %) con actividad física moderada y 96 (63 %) con actividad física intensa. Únicamente 25 tenían una vida sedentaria. Las figuras muestran la distribución del consumo de cigarrillo, de gramos de alcohol y tazas de café al día

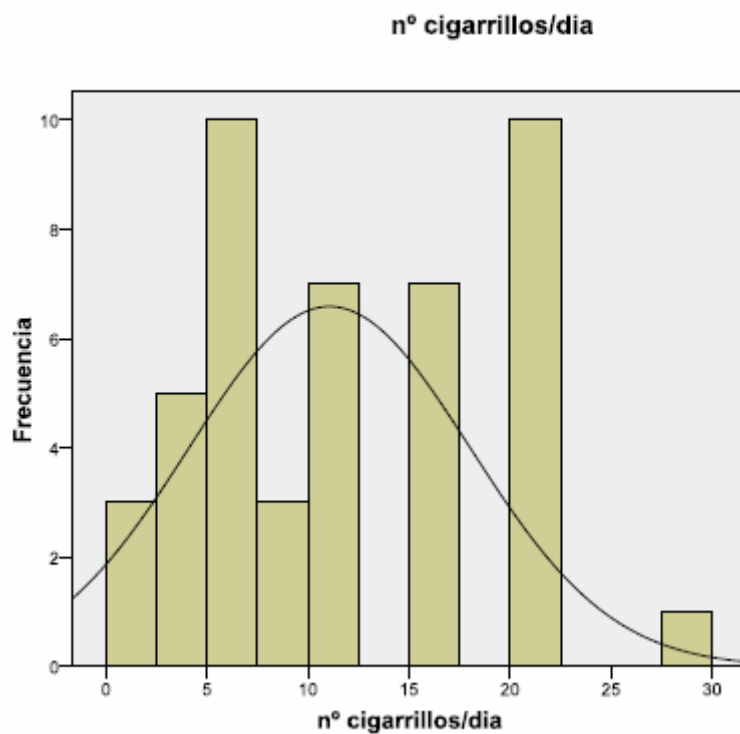


Figura 16. Consumo cigarrillos/día

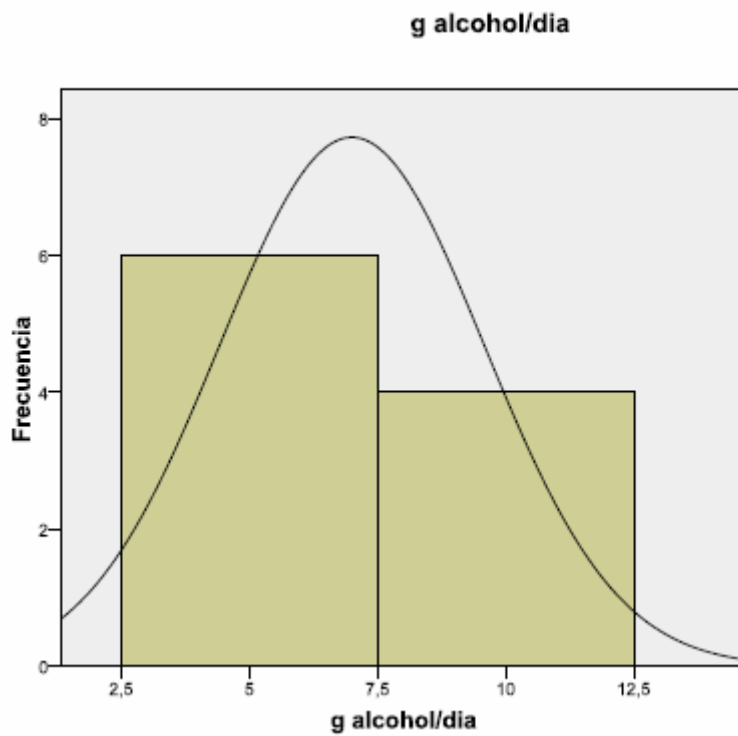


Figura 17. Consumo alcohol/día

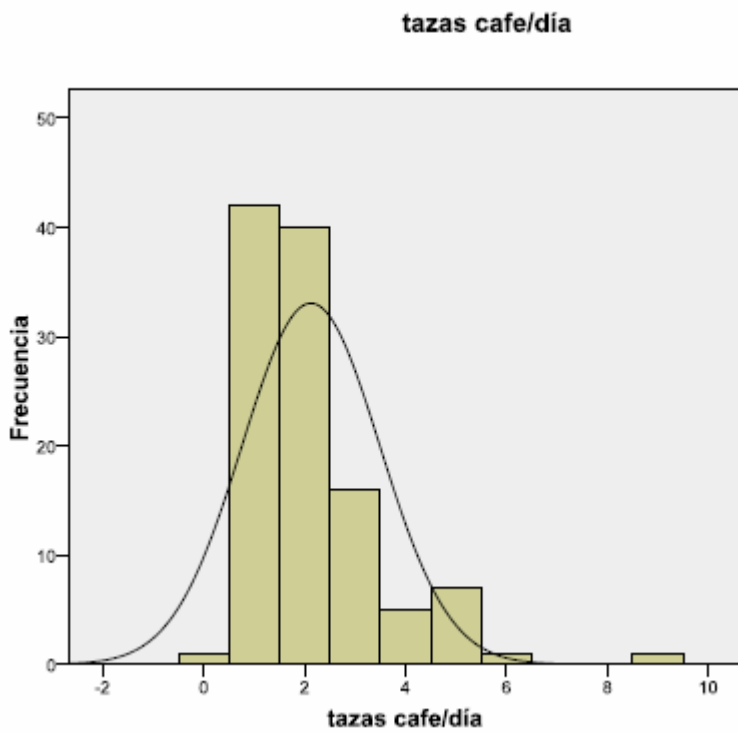


Figura 18. Consumo café/día

Ingesta de Calcio

El consumo de calcio calculado mediante una encuesta dietética realizada únicamente con el calcio obtenido a partir de productos lácteos, era de 645 mg/día con una desviación estandar de 335 mg/día. Si una dieta normal produce un incremento de 300 mg/día, la mayor parte de las mujeres ingería menos de 1200 mg/día que es la cantidad recomendada en mujeres postmenopáusicas

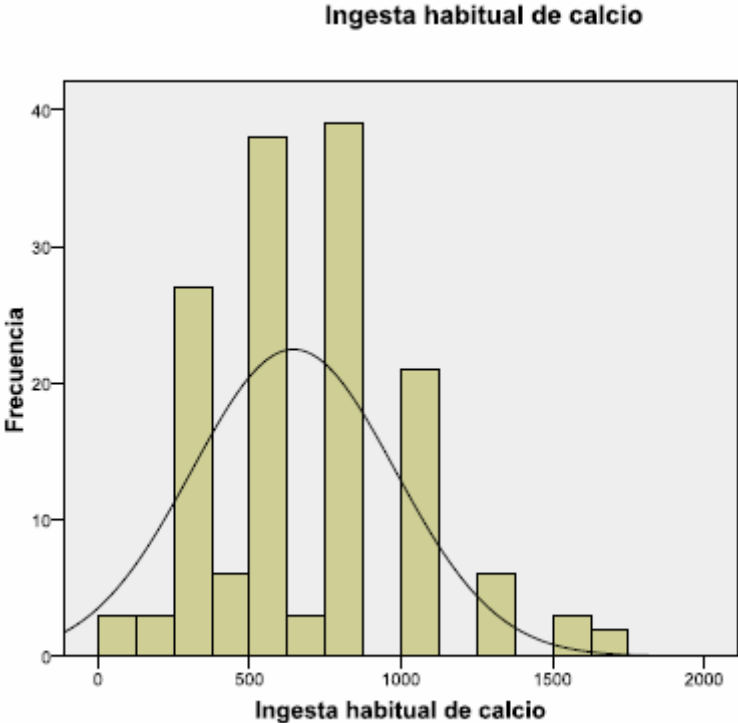


Figura 19. Ingesta de calcio en productos lácteos

Fracturas

Un total de 14 mujeres (9 %) tenían una fractura por fragilidad previa (Figura 20). Eran fracturas de colles en su totalidad y 15 mujeres tenían antecedentes de fractura de cadera en familiares de primer grado (Figura 20)

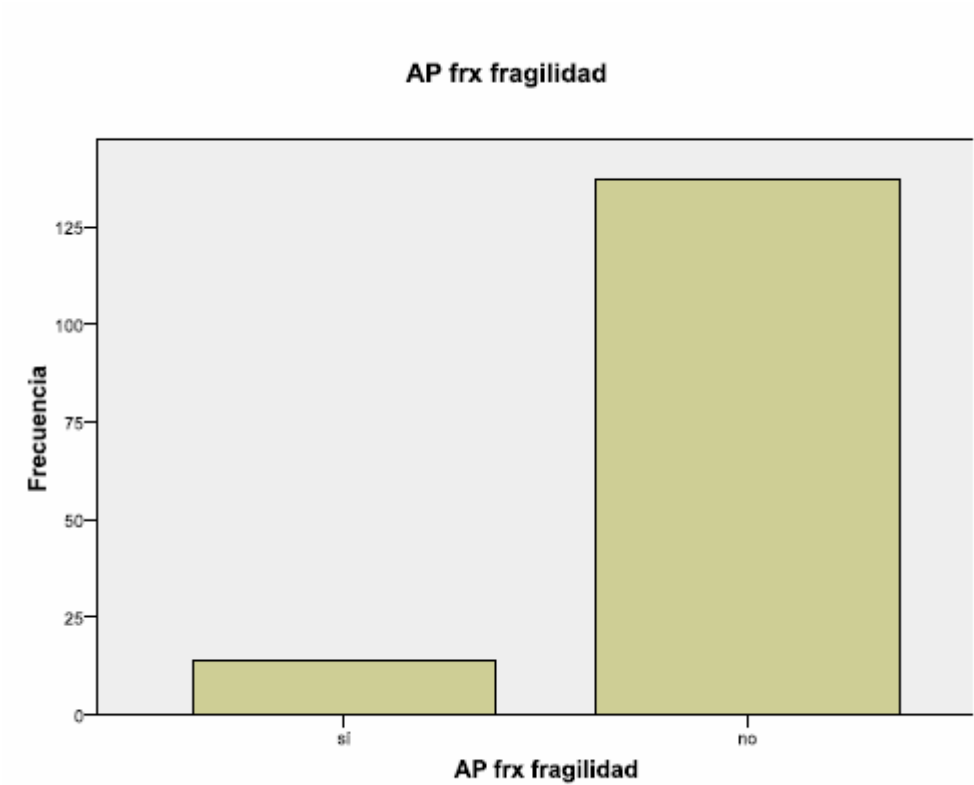


Figura 20. Antecedentes de fracturas por fragilidad

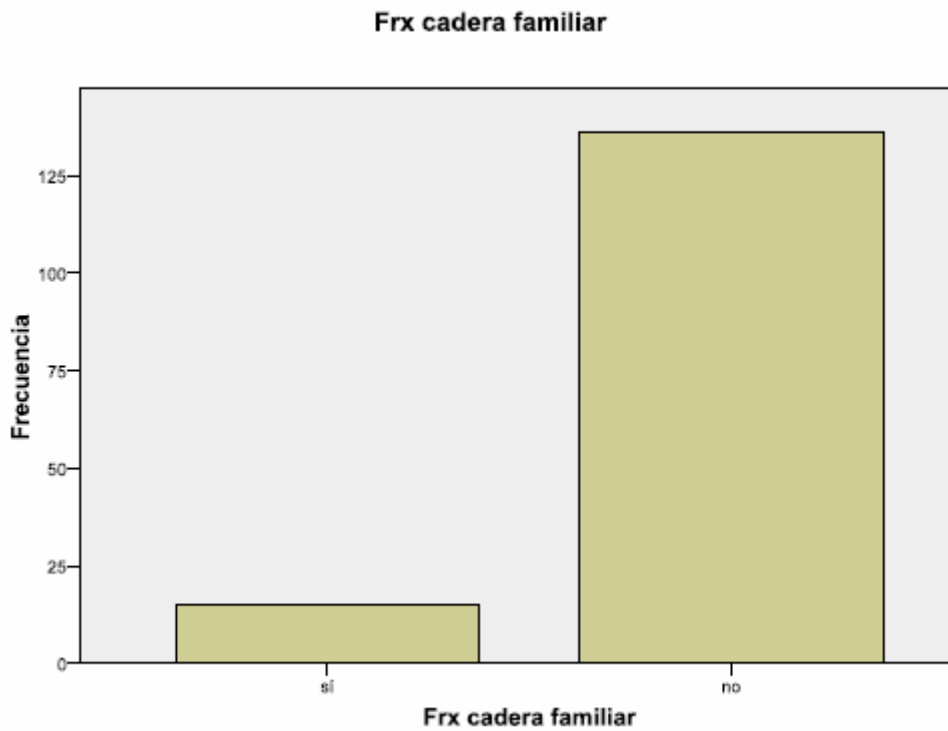


Figura 21. Antecedentes de fracturas de cadera en familiares de primer grado

Caídas

Un total de 29 mujeres habían sufrido al menos una caída (19 %) en el último año (Figura 22) y todas ellas , salvo una, eran capaces de levantarse de una silla sin ayuda

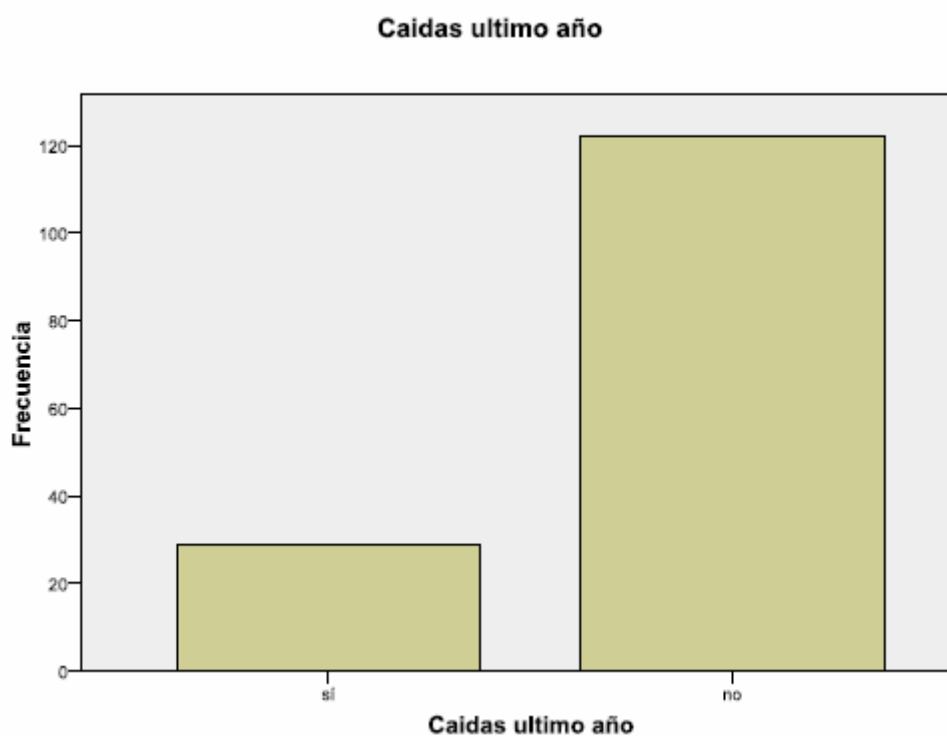


Figura 22. Caídas en el último año

Fármacos

La comorbilidad global de estas mujeres era muy pequeña, por ello pocas mujeres estaban tomando fármacos que pudieran afectar al metabolismo óseo. 9 mujeres (6 %) tomaban tiazidas, 3 (2 %) eran tratadas con betabloqueantes, 15 (10 %) recibían estatinas y 1 (0,7 %) inhalaban corticoides.

Datos de exploración

La talla media era de 159 cm con una desviación estandar de 6 cm. El rango oscilaba entre 142 cm y 174 cm con una mediana de 159 cm. El peso medio era de 63 Kg con una desviación estandar de 10 Kg, un rango de 42 a 107 Kg y una mediana de 63 Kg. El Índice de Masa Corporal (IMC) era de 25 con una desviación estandar de 4, un rango entre 17 y 44 y una mediana de 24,5. La mayor parte de las mujeres no tenían sobrepeso ni eran obesas.

Las figuras muestran los histogramas de estas variables

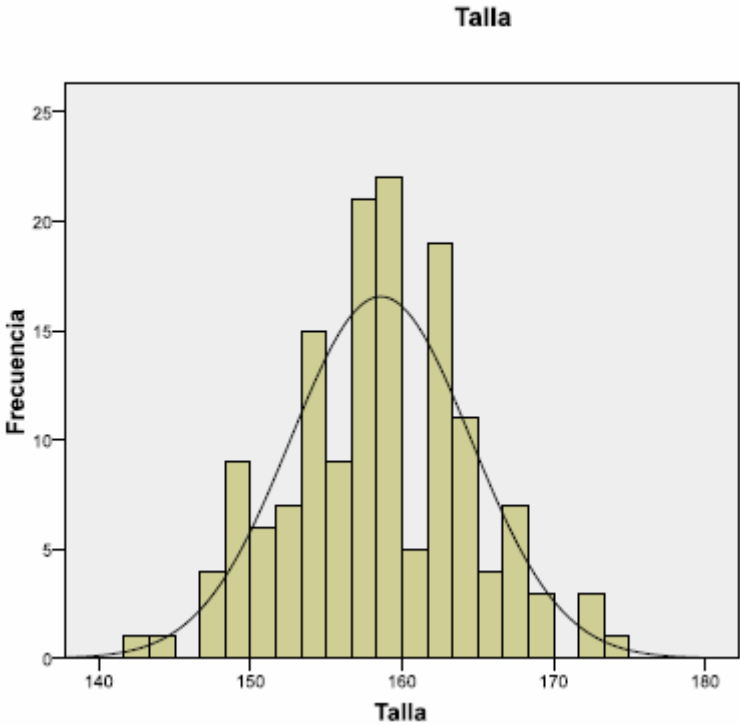


Figura 23. Talla de la población

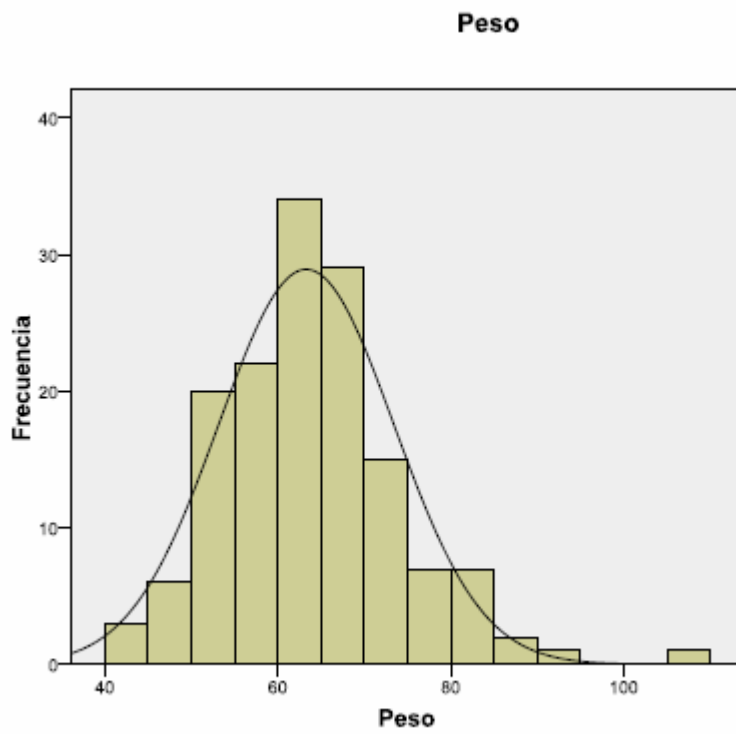


Figura 24. Distribución del peso de la población

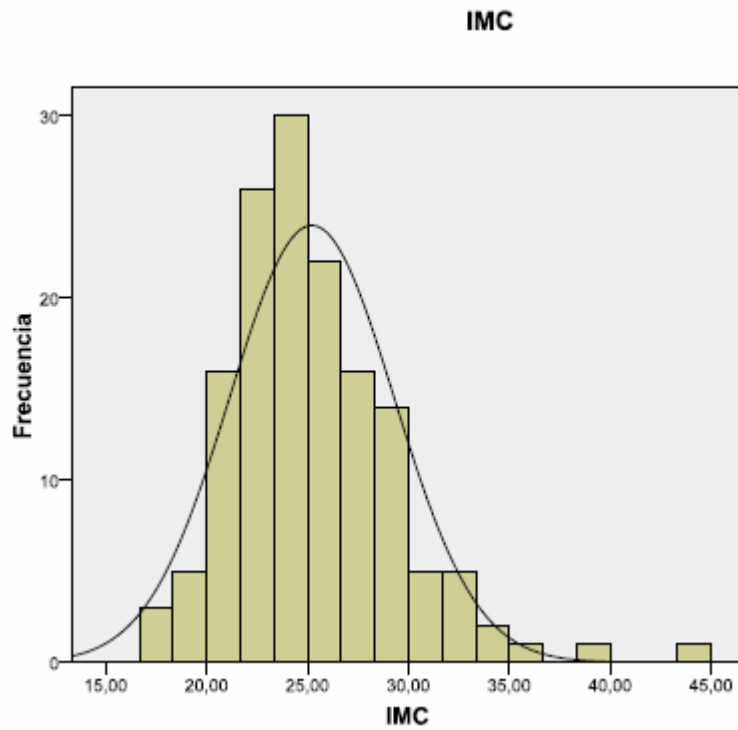


Figura 25. Distribución del Índice de Masa Corporal (IMC) de la población

Datos del metabolismo fosfocálcico

El valor medio del calcio fue de $9,47 \pm 0,40$ mg/dl con un rango entre 8,5 y 11,46 mg/dl y una mediana de 9,42 mg/dl. Había una paciente con un calcio inicial de 11,42 mg/dl acompañado de una PTH (paratohormona) elevada que fue diagnóstica de hiperparatiroidismo asintomático siendo excluida del estudio. La Figura 26 muestra la distribución del mismo

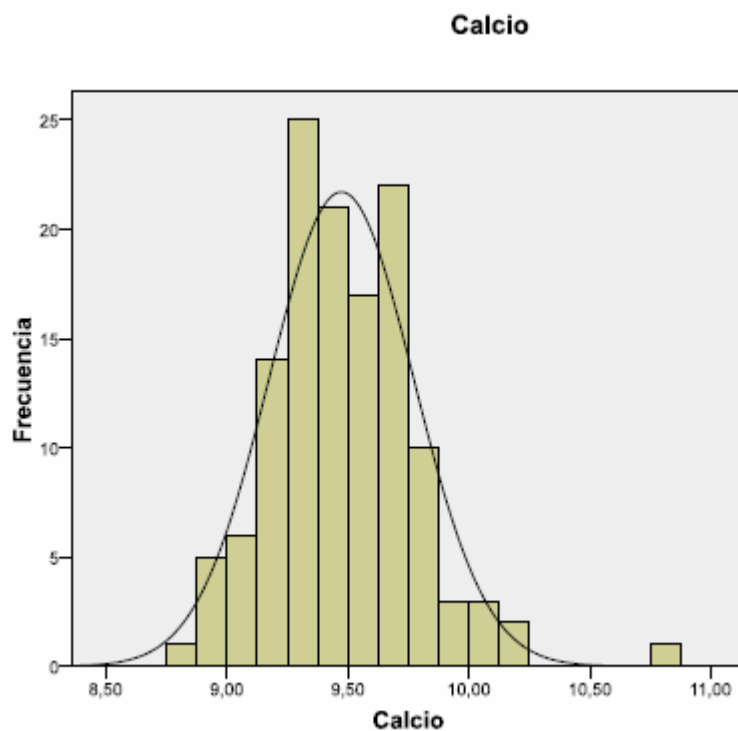


Figura 26. Distribución del calcio en la población estudiada

Vitamina D (25-hidroxicolecalciferol)

La media de 25-hidroxicolecalciferol (25OHD) fue de 24 ng/ml con una desviación estandar de 9,5 ng/ml y un rango entre 8,9 ng/ml y 56 ng/ml. La media fue de 23 ng/ml. La figura 27 muestra la distribución de los niveles de vitamina D

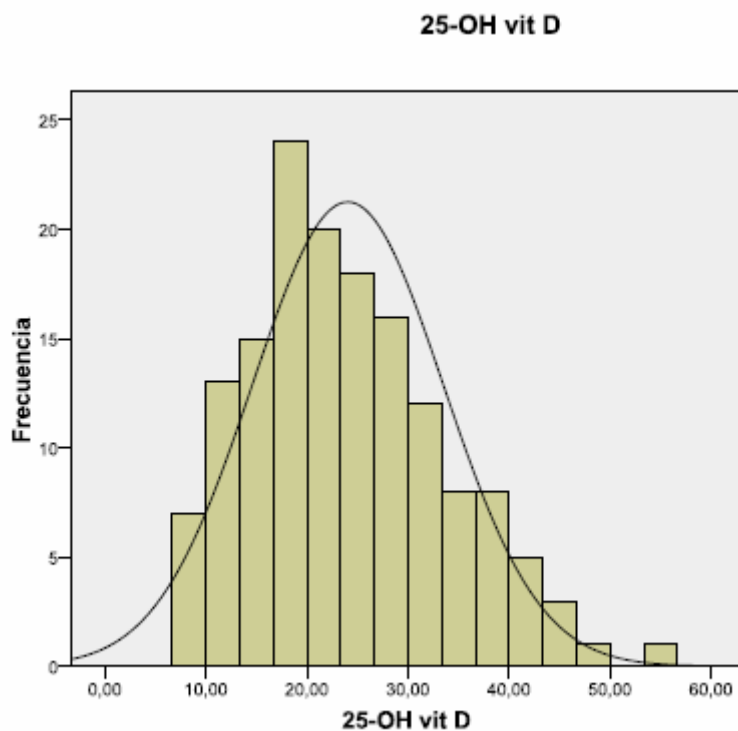


Figura 27. Distribución de los niveles de vitamina D

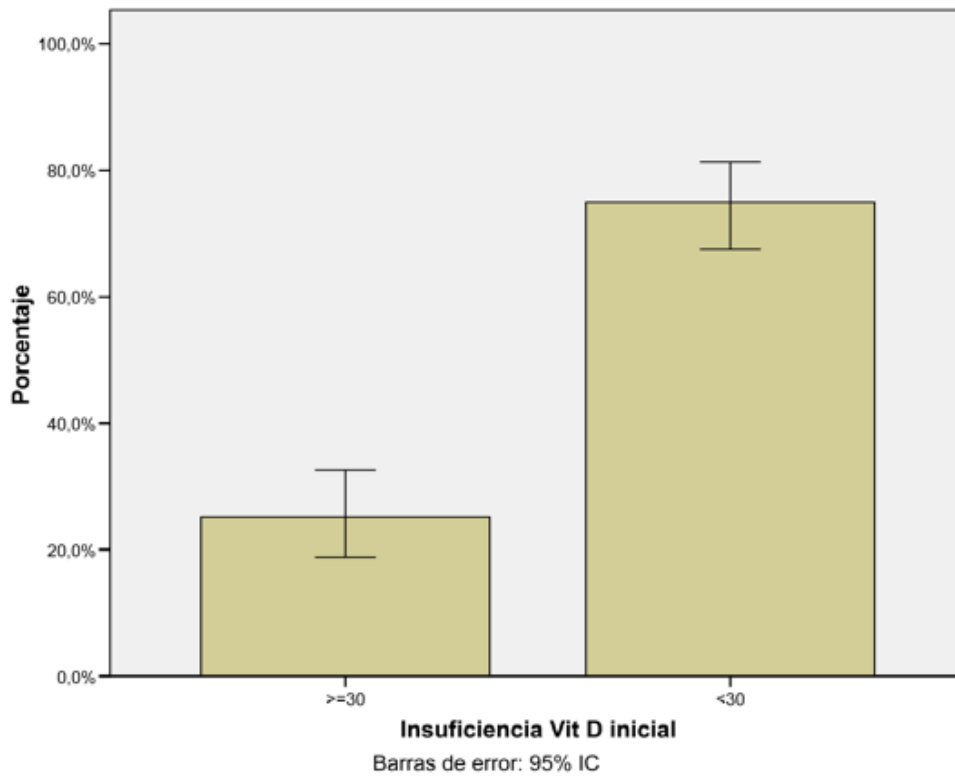


Figura 28. Porcentaje de mujeres con insuficiencia de vitamina D. Estudio inicial

El porcentaje de mujeres con insuficiencia de vitamina D (25OHD < 30 ng/ml) era de un 75 % (113 mujeres).

Al final del estudio con los diferentes tratamientos empleados se observó una disminución significativa de las mujeres con insuficiencia de vitamina D que pasó de un 75 % a un 46 %.

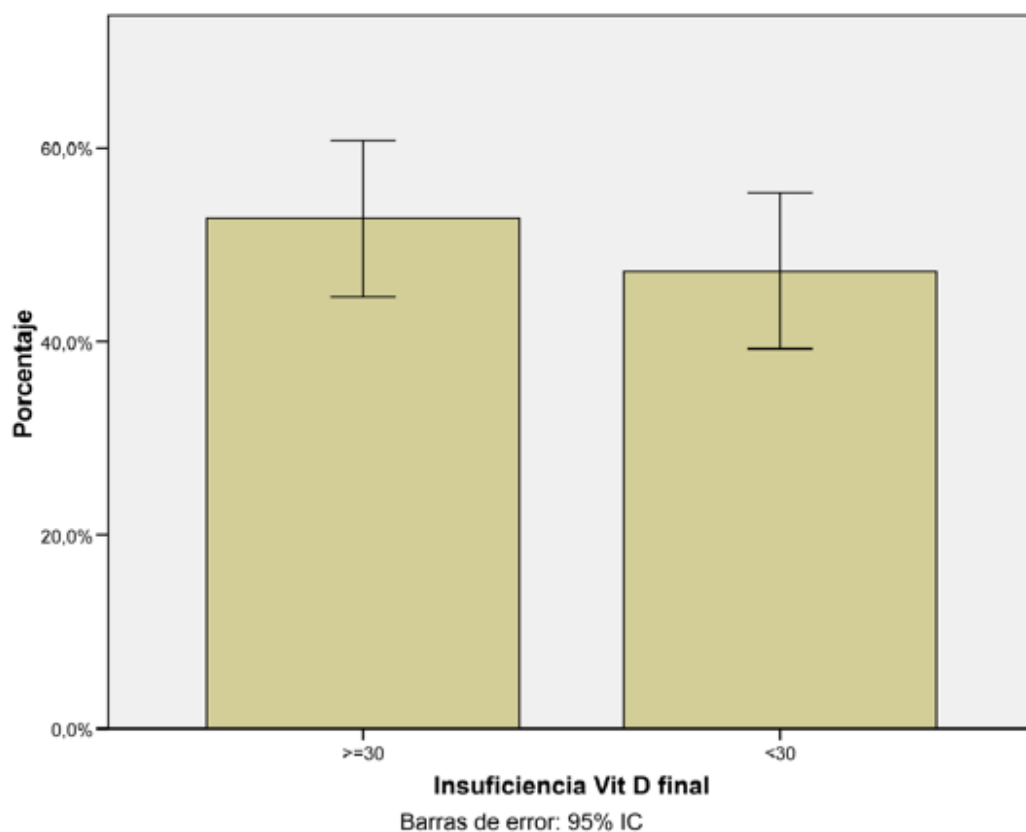


Figura 29. Porcentaje de mujeres con insuficiencia de vitamina D al final del estudio

La diferencia de mujeres, principio y final del estudio, con insuficiencia de vitamina D era estadísticamente significativa $p= 0,0001$

El porcentaje de mujeres con deficiencia de vitamina D ($25\text{OH D} < 20 \text{ ng/ml}$) fue de un 39 % (Figura 30)

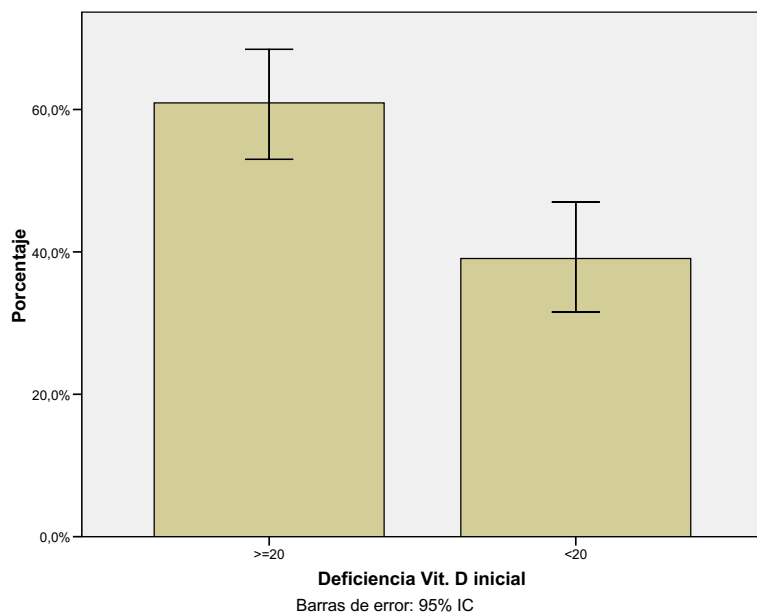


Figura 30. Mujeres con deficiencia de vitamina D al inicio del estudio

Al final del estudio el porcentaje de mujeres con deficiencia de vitamina D (25OHD < 20ng/ml) fue de 11 % siendo la diferencia estadísticamente significativa (Figura 31)

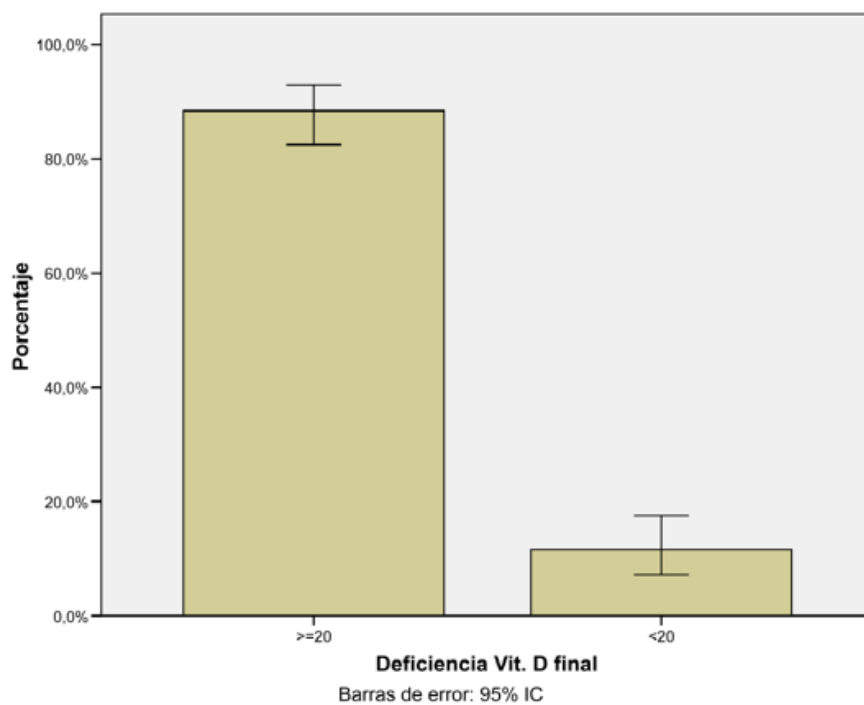


Figura 31. Porcentaje de mujeres con deficiencia de Vitamina D al final del estudio

Paratohormona (PTH)

La concentración plasmática media de la PTH fue de 36 ± 13 pg/ml con un rango entre 5,5 y 85 pg/ml. La mediana era de 35 pg/ml (Figura 31)

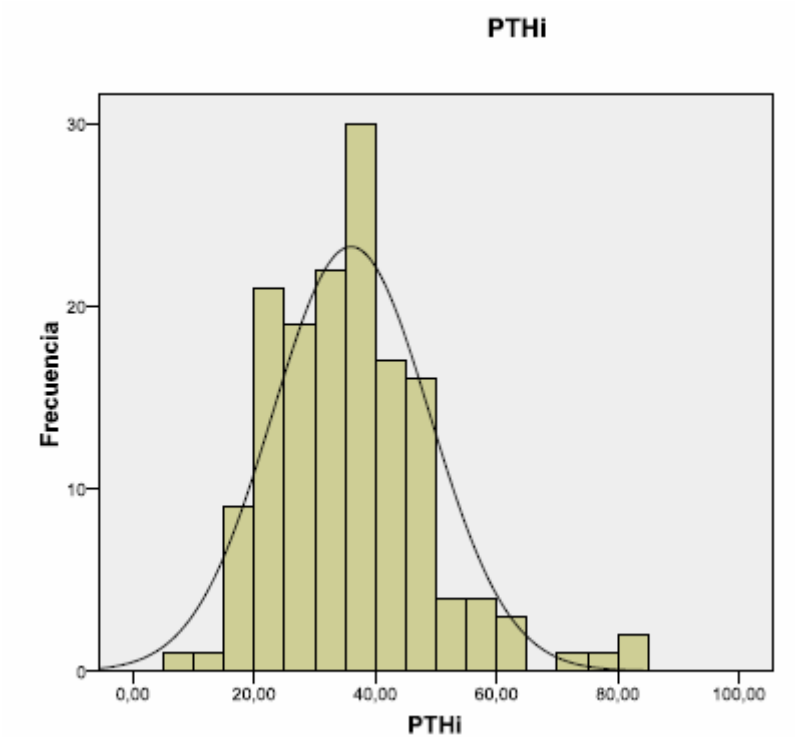


Figura 32. Distribución de la paratohormona en la población

Marcadores de remodelado óseo

- Marcador de resorción

La media de CTX era de 0,320 ng/ml con una desviación estandar de 0,14 ng/ml. El rango se extendía entre 0,043 y 0,814 siendo la mediana de 0,298 (Figura 33)

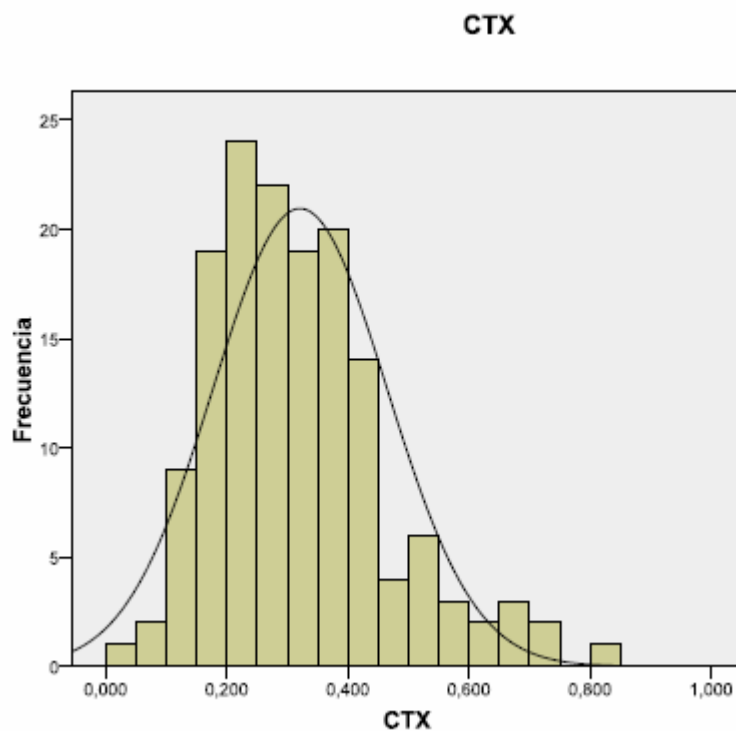


Figura 33. Distribución de CTX

Marcador de formación (P1NP)

El valor medio de P1NP era de 50 nmol/mg con una desviación estandar de 20 nmol/mg de creatinina. El rango se extendía entre 19 y 209 nmol/mg creatinina con una mediana de 56 nmol/mg de creatinina (Figura 34)

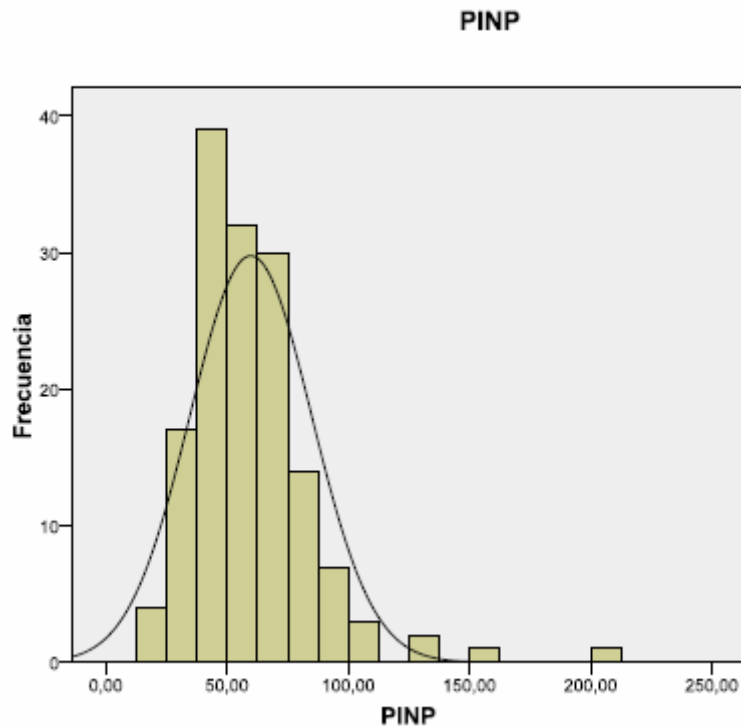


Figura 34. Distribución de marcador de formación, P1NP

Correlaciones

Se consideró el total de la población para establecer correlaciones bivariadas entre vitamina D, PTH, CTX y P1NP. En la población inicial se observaba una correlación negativa entre 25OHD y PTHi ($r: -0,305$, $p=0001$) y una correlación positiva entre PTHi y CTX ($r:0,158$, $p=0,05$) aunque en este caso la correlación era debil. Al final de las 12 semanas, con los distintos procedimientos terapéuticos empleados, no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa

DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES

Las mujeres del estudio fueron distribuidas de forma aleatorizada en tres grupos:

1. Mujeres que no recibían suplementos, el incremento de vitamina D se podría producir a expensas de la radiación ultravioleta de la luz solar (49 mujeres).
2. Mujeres que recibían suplementos de calcio (1000 mg/día) y vitamina D (800 UI/día) (52 mujeres)
3. Mujeres que recibían suplementos de calcio (1000 mg/día), vitamina D (800 UI/día) y genisteína (90 mg /día) (50 mujeres)

CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS

Datos clínicos

En las siguientes tablas aparecen reflejadas las características de cada uno de los grupos para determinar si son homogéneos

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	p
Edad (años)	55 ± 3	55 ± 3	55 ± 4	>0,05
Menarquia (años)	13 ± 1.3	13 ± 1.1	13 ± 1.2	>0,05
Menopausia (años)	49 ± 4	50 ± 3	48 ± 4	>0,05
Paridad	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.8	1.7 ± 0.9	>0,05
Lactancia (meses)	8 ± 5	7 ± 6	9 ± 9	>0,05
Menopausia quirúrgica	3 (6 %)	4 (8 %)	12 (24 %)	0,012

Tabla 3. Características ginecologicas

La tabla 3 muestra los datos ginecológicos de las mujeres de los tres grupos siendo comparables, sin diferencias estadísticamente significativas salvo en un dato, menopausia quirúrgica. El porcentaje de mujeres con menopausia quirúrgica era superior, de forma estadísticamente significativa, en el grupo que recibió suplementos de calcio, vitamina D e isoflavonas. Estas mujeres podrían tener un mayor riesgo de baja masa ósea con lo que el beneficio de los suplementos podría ser superior.

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	p
Cigarros/día	11 ± 5	13 ± 9	10 ± 6	>0,05
Gramos alcohol/día	7 ± 3	7 ± 3	8 ± 4	>0,05
Tazas café/día	2,4 ± 1,7	2 ± 1	2,1 ± 1,4	>0,05

Tabla 4. Hábitos tóxicos

La presencia de hábitos tóxicos (tabaco, alcohol y consumo excesivo de café) que pueden ejercer un efecto perjudicial sobre el remodelado óseo es similar entre los tres grupos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. Llama la atención que la ingesta de alcohol es pequeña lo que puede ser un dato beneficioso

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	P
Consumo calcio mg/día	610 ± 293	627 ± 346	648 ± 362	>0,05
Actividad Física Sedentaria	5 (10 %)	15 (29 %)	5 (10 %)	0,025

Tabla 5. Ingesta de calcio y actividad física

La ingesta de calcio es similar en los tres grupos. Hay que tener en cuenta que la cantidad de calcio expresada es la derivada de los productos lácteos. Habría que añadirle la procedente de otros alimentos de la dieta que corresponde aproximadamente a unos 300 mg/día en individuos con dieta normal. En todos los casos la cantidad recibida es inferior a la recomendada para mujeres postmenopáusicas (1000-1200 mg/día).

La actividad física es similar en el grupo sometido a radiación solar y el grupo que recibe suplementos de calcio, vitamina D e isoflavonas. El grupo que

recibió calcio y vitamina D presenta un mayor sedentarismo. Sin embargo, debemos considerar que globalmente todas las mujeres realizan una actividad física razonable.

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	P
Fracturas por fragilidad	3 (6 %)	7 (14 %)	4 (8 %)	>0,05
Fracturas familiares	0 (0 %)	9 (17 %)	6 (12 %)	>0,05

Tabla 6. Antecedentes de fracturas

No existen diferencias entre los tres grupos ni en la presencia de fracturas por fragilidad que podría ser un dato que indicara una menor resistencia ósea y no hay diferencias en fracturas de cadera familiares. Este último dato es un elemento que forma parte del FRAX, escala de riesgo de fractura patrocinada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	P
Talla cm	159 ± 7	158 ± 5	159 ± 6	>0,05
Peso Kg	64 ± 11	62 ± 10	64 ± 10	>0,05
IMC	25 ± 5	25 ± 4	25 ± 4	>0,05

Tabla 7. Datos de exploración física

Los datos de talla , peso e Índice de Masa corporal (IMC) son similares entre los tres grupos. El IMC muestra un valor media de 25 que está fuera del rango de bajo peso que sería un factor de riesgo de osteoporosis y está fuera del rango de sobrepeso que sería un factor protector de osteoporosis

Parámetros del Metabolismo Fosfocálcico

	Radiación solar	Calcio + Vitamina D	Calcio+ vitamina D + Isoflavona	P
Calcio (mg/dl)	9,4 ± 0,23	9,5 ± 0,28	9,5 ± 0,36	>0,05
25OHD (ng/ml)	23 ± 9	26 ± 10	24 ± 9	>0,05
PTHi (pg/ml)	39 ± 13	31 ± 8	38 ± 15	0,006
CTX (ng/ml)	0,346 ± 0,15	0,320 ± 0,15	0,296 ± 0,13	>0,05
P1NP (nmol/mg proteína)	58 ± 22	61 ± 22	60 ± 30	>0,05

Tabla 8. Tabla. Parámetros Metabolismo Fosfocálcico

Los tres grupos son comparables sin existir diferencias estadísticamente significativas en las características de la población, salvo un mayor porcentaje de mujeres sedentarias en grupo que recibía calcio y vitamina D y un mayor número de mujeres con menopausia quirúrgica en el grupo que recibió isoflavonas. Los datos de la exploración y analíticos son similares. No había diferencias , estadísticamente significativa, entre los tres grupos en las mujeres con deficiencia de vitamina D (51 %, 31 % y 36 %). Tampoco se observaron diferencias, estadísticamente significativas, en los porcentajes de insuficiencia de vitamina D (80 %, 65 %, 80 %)

**EFFECTO DE LAS DIFERENTES ACTUACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS
ANALÍTICOS DEL METABOLISMO ÓSEO**

Grupo sin suplementos, efecto de la radiación ultravioleta

	Inicial	Final	p
Calcio (mg/dl)	9,42 ± 0,23	9,37 ± 0,38	>0,05
25OHD (ng/ml)	23 ± 9	29 ± 10	0,0001
PTHi (pg/ml)	39 ± 13	21 ± 12	0,0001
CTX (ng/ml)	0,345 ± 0,15	0,308 ± 0,14	0,037
P1NP nmol/mg creatinina)	58 ± 22	52 ± 20	0,008

Tabla 9. Efecto de la radiación ultravioleta sobre parámetros del metabolismo fosfocálcico

El efecto de la radiación solar es claramente positivo. Se incrementa de forma estadísticamente significativa los niveles de vitamina D y disminuyen los de la PTH, como consecuencia se produce una inhibición del remodelado óseo, disminuye CTX y P1NP. Estos datos muestran un perfil favorable sobre la salud ósea. En la tabla 10 se observan el número de horas de sol que hubo en el año 2013 en Valladolid distribuido por meses

Valladolid

Número de horas de sol									
2009	1.722	--	2.468	2.941	3.068	2.815	--	2.860	--
2010	1.511	2.278	2.244	2.764	2.857	2.559	--	2.654	2.540
2011	1.633	--	2.443	2.840	2.960	2.831	--	2.791	--
2012	1.540	2.724	2.384	2.882	2.920	2.736	--	2.707	2.643
2013	1.458	2.555	2.182	2.738	2.901	2.581	2.642	2.647	2.561
2012 Diciembre	83	131	61	110	112	115	99	87	61
2013 Enero	69	126	86	127	138	104	164	103	88
Febrero	49	135	78	150	172	91	122	151	134
Marzo	120	152	108	126	142	122	139	141	136
Abril	148	223	181	224	228	210	208	219	222
Mayo	98	243	197	280	296	241	221	256	287
Junio	163	297	257	315	348	325	303	309	336
Julio	216	310	342	359	386	359	330	355	381
Agosto	185	318	346	373	390	371	349	354	360
Septiembre	131	270	265	275	293	277	283	288	251
Octubre	128	207	162	154	216	215	197	190	169
Noviembre	36	118	63	195	157	122	149	150	133
Diciembre	117	155	96	161	137	145	177	123	65
Precipitación acuosa (milímetros)									
2009	1.179,1	242,8	532,8	471,1	312,4	380,6	485,0	336,3	390,7
2010	1.263,1	402,2	606,1	559,4	414,7	531,6	651,5	530,0	530,9
2011	842,2	356,7	504,7	502,4	246,8	397,9	380,9	324,9	271,5
2012	1.099,3	340,3	410,1	--	363,6	365,1	433,4	372,1	345,8
2013	1.372,5	349,6	661,4	505,9	437,2	506,5	636,3	507,3	481,4
2012 Diciembre	91,1	16,1	43,6	41,1	12,1	26,0	41,0	23,4	23,6
2013 Enero	206,7	32,1	84,7	58,2	41,6	66,0	61,1	41,0	34,0
Febrero	193,9	21,1	37,1	40,6	25,5	31,5	30,6	25,4	23,4
Marzo	95,1	78,0	115,8	101,0	97,6	131,6	135,6	129,8	124,6
Abril	131,7	33,6	30,2	26,0	39,6	40,4	84,4	56,2	39,6
Mayo	157,3	35,2	62,1	22,8	31,3	68,8	40,6	28,6	17,0
Junio	102,5	15,0	65,4	16,6	15,2	7,0	49,4	24,0	16,0
Julio	12,9	4,4	40,4	33,3	7,5	9,2	81,2	6,8	28,6
Agosto	28,8	10,0	2,1	7,7	0,0	0,4	5,0	5,6	0,0
Septiembre	76,0	26,6	29,6	38,9	61,4	27,4	12,6	51,8	58,8
Octubre	44,4	34,4	71,3	74,6	50,1	32,4	56,8	73,0	64,6
Noviembre	248,2	26,2	50,6	24,9	12,8	23,4	15,4	7,6	6,6
Diciembre	75,0	33,0	72,1	61,3	54,6	67,4	63,6	57,5	68,2

Fuente de información: Agencia Estatal de Meteorología

Tabla 10. Número horas de sol en Valladolid

La tabla muestra que durante los meses previos a la extracción, las horas de sol mensual son claramente inferiores a las de los meses de verano, asociándose a un claro descenso del número de precipitaciones. Estos datos indican la mayor radiación ultravioleta durante estos meses

Grupo de suplementos con calcio y vitamina D

	Inicial	Final	p
Calcio (mg/dl)	9,49 ± 0.28	9,46 ± 0.40	>0,05
25OHD (ng/ml)	25 ± 10	33 ± 8	0,0001
PTHi (pg/ml)	32 ± 8	18 ± 10	0,0001
CTX (ng/ml)	0,322 ± 0,15	0,307 ± 0,15	>0,05
P1NP nmol/mg creatinina)	59 ± 20	52 ± 21	0,002

Tabla 11. Efecto de los suplementos de calcio y vitamina D radiación sobre parámetros del metabolismo fosfocálcico

La administración de suplementos de calcio y vitamina D tiene un efecto similar al de la radiación ultravioleta. Se incrementan los niveles de vitamina D, disminuye la PTH y disminuye P1NP de forma estadísticamente significativa. El descenso de CTX no es significativo

Grupo de suplementos de calcio, vitamina D y genisteína

	Inicial	Final	P
Calcio (mg/dl)	9,5 ± 0,38	9,42 ± 0,49	>0,05
25OHD (ng/ml)	24 ± 9	31 ± 8	0,0001
PTHi (pg/ml)	38 ± 16	22 ± 11	0,0001
CTX (ng/ml)	0,299 ± 0,13	0,283 ± 0,10	>0,05
P1NP nmol/mg creatinina)	58 ± 28	47 ± 18	0,0001

Tabla 12. Efecto de suplementos de calcio, vitamina D y genisteína sobre parámetros del metabolismo fosfocálcico

La administración de suplementos de calcio, vitamina D y genisteína produjo un efecto similar al observado con calcio y vitamina D sin que la isoflavona incrementara los efectos conseguidos con calcio y vitamina

Comparación entre grupos

Al comparar los efectos de las tres actuaciones sobre los parámetros del metabolismo del calcio no se observaron diferencias significativas entre los mismos. El efecto es similar en los diferentes procedimientos empleados para incrementar los niveles de vitamina D que al suprimir la PTH consigue un efecto beneficios sobre el remodelado óseo. En las gráficas pueden observarse estos datos. Se denomina A al derivado de la radiación ultravioleta, B a los suplementos de calcio y vitamina D y C a los suplementos de calcio, vitamina D y genisteína

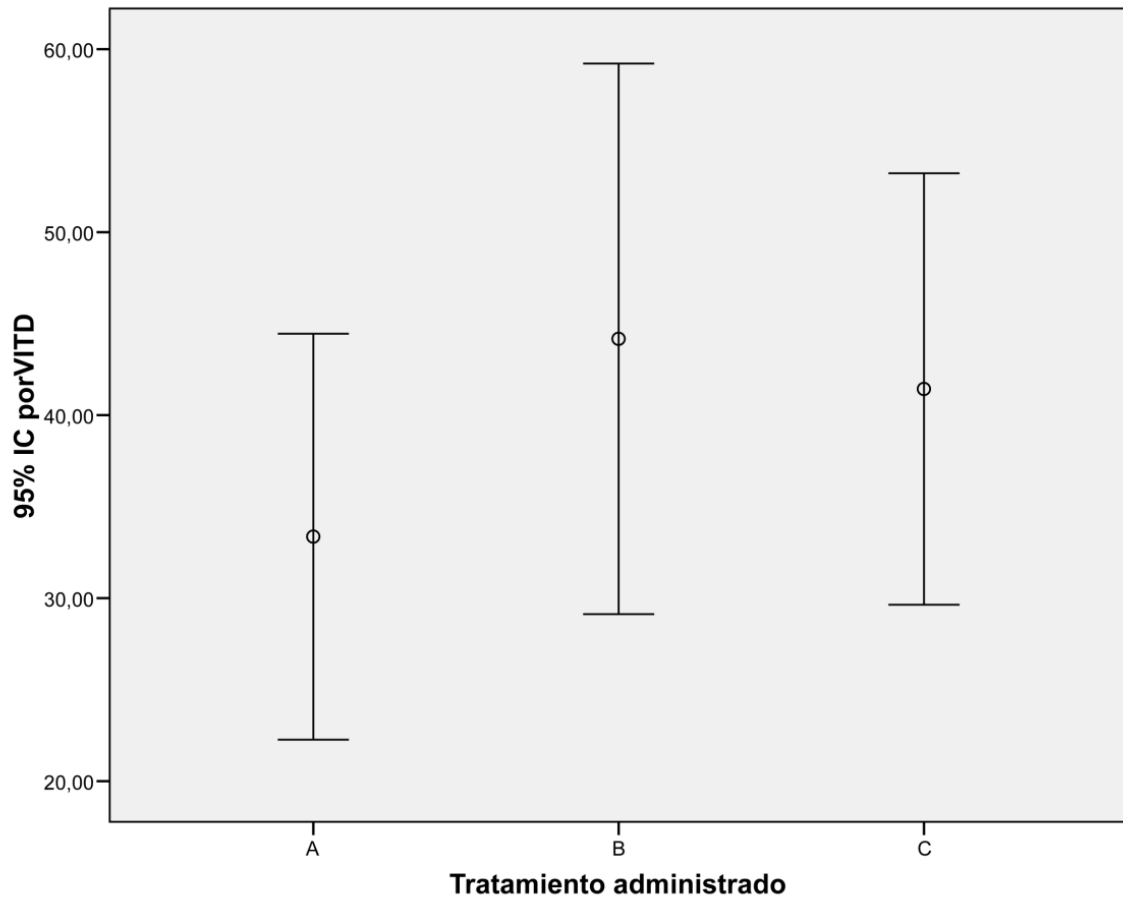


Figura 35. Efecto sobre la vitamina D de los tres procedimientos empleados (A: Radiación ultravioleta, B: Suplementos de calcio y vitamina D, C: Suplementos de Calcio, vitamina D y genisteína)

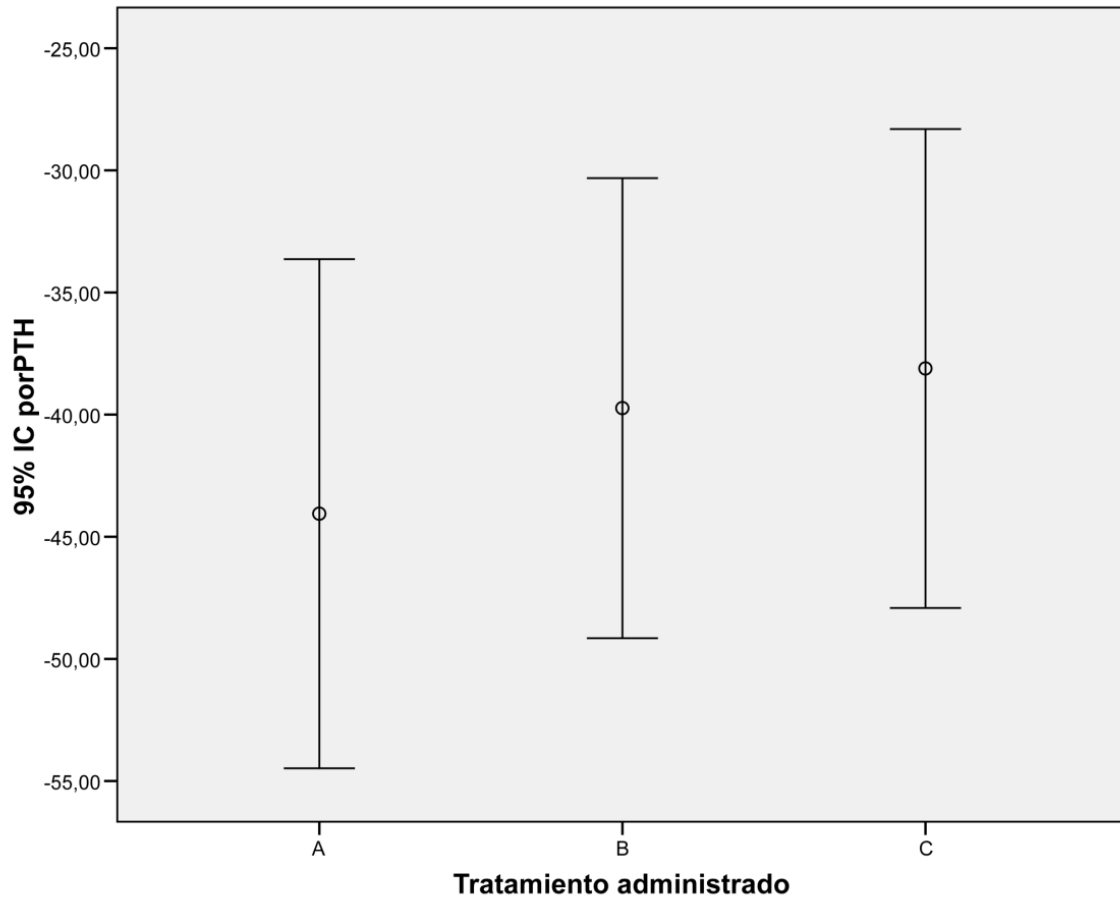


Figura 36. Efecto sobre la PTH de los tres procedimientos empleados (A: Radiación ultravioleta, B: Suplementos de calcio y vitamina D, C: Suplementos de Calcio, vitamina D y genisteína)

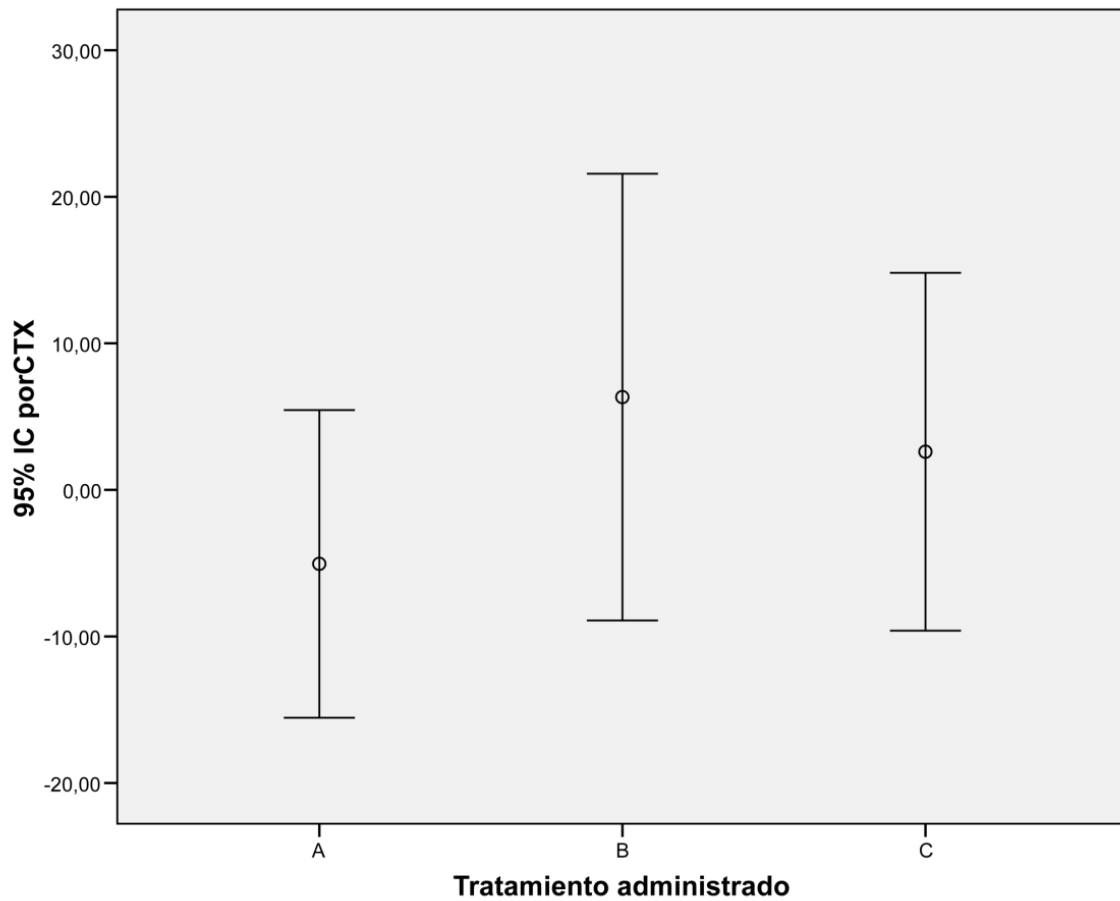


Figura 37. Efecto sobre CTX de los tres procedimientos empleados (A: Radiación ultravioleta, B: Suplementos de calcio y vitamina D, C: Suplementos de Calcio, vitamina D y genisteína)

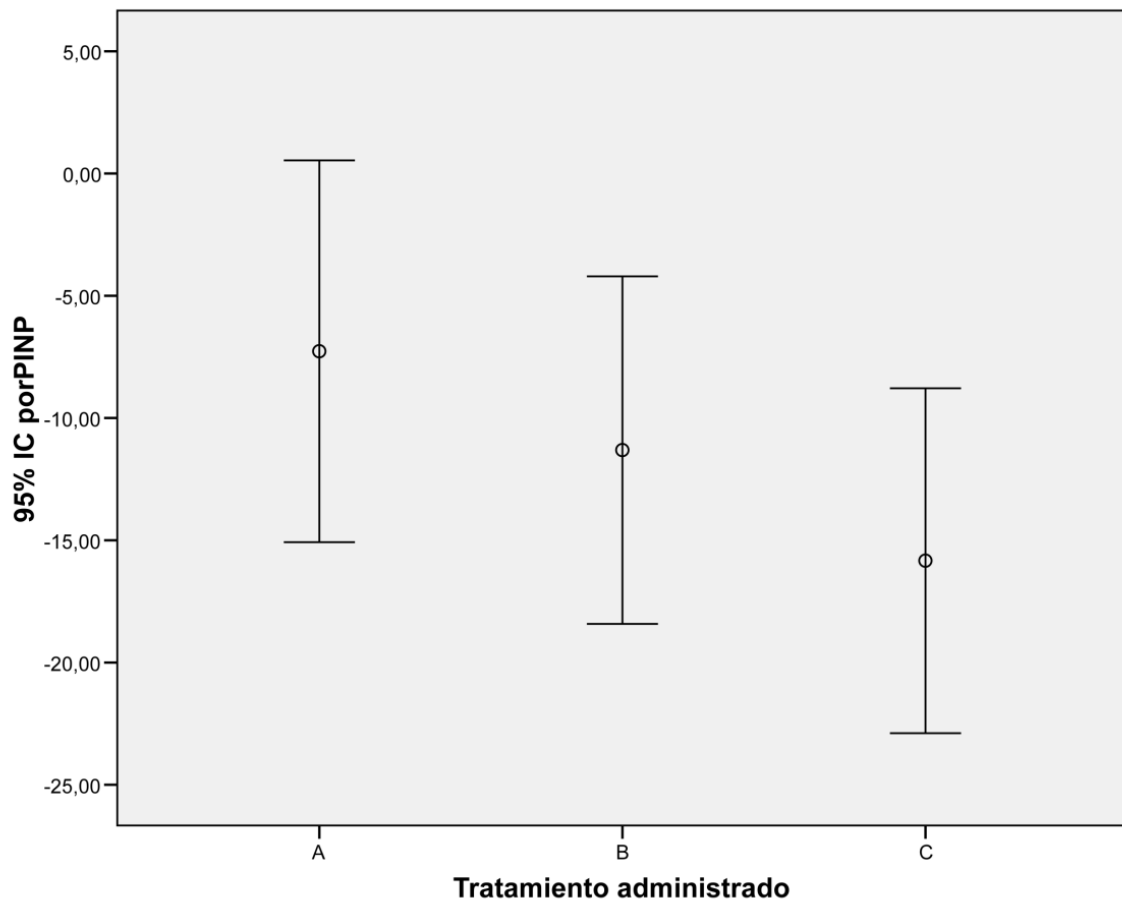


Figura 38. Efecto sobre P1NP de los tres procedimientos empleados (A: Radiación ultravioleta, B: Suplementos de calcio y vitamina D, C: Suplementos de Calcio, vitamina D y genisteína)

Adherencia al tratamiento

La adherencia al tratamiento fue valorada mediante el test de Morinski-Green consiguiéndose una adherencia muy elevada, 130 individuos (88 %) tenían una adherencia muy elevada y 4 individuos (3 %) con adherencia moderada. Únicamente en 9 individuos (6 %) la adherencia fue baja. La distribución fue similar entre los tres tipos de actuación, sin diferencias estadísticas entre los mismos. Estos datos indican una buena calidad en la realización del estudio, teniendo en cuenta además que no se perdió ningún individuo. A ello contribuyó la duración del estudio, 12 semanas, y los escasos efectos adversos. Solo destacar la presencia de meteorismo en 13 pacientes

NUTRIGENÉTICA

El estudio nutrigenético se ha realizado con el total de la población. En los datos previos se ha observado que los tres grupos, de forma basal son comparables y la respuesta de las mujeres a los tres suplementos nutricionales empleados, placebo (radiación ultravioleta), suplementos de calcio y vitamina D y suplementos de calcio, vitamina D y genisteína., han sido similares. Esto permite analizar de forma conjunta el total de la población incrementando la potencia estadística del análisis.

Se han analizado tres SNPs localizados muy próximos entre si en la región amino terminal del brazo largo del cromosoma 11. La proximidad entre los mismos determina que, muy posiblemente, la trasmisión se realice conjuntamente. Ello ha determinado que en el análisis se hayan incluido haplotipos.

En función de los alelos y los haplotipos se ha valorado su influencia en las cifras basales de los marcadores del remodelado óseo, vitamina D y PTH y los cambios de estos parámetros de forma global y en función de los procedimientos nutricionales empleados. Finalmente, se han dividido las mujeres en dos grupos, respondedoras y no respondedoras en función de los niveles de vitamina D alcanzado a los tres meses. El punto de corte establecido fue de 20 ng/ml. Los SNPs analizados han sido el rs144410 (BsmI), rs731236 (TaqI) y rs7975232 (ApaI).

Rs 1544410 (BsmI)

El cambio de base producido en este polimorfismo es A>G. Clásicamente los genotipos observados se han denominado BB,Bb y bb. En presencia del alelo A se asignaría alelo B y al alelo G le asignaríamos b. La distribución de los genotipos sería la siguiente:

- BB: 24 (17 %)
- Bb: 73 (51 %)
- bb: 45 (32 %)

La Figura 39 muestra la representación gráfica de estos porcentajes

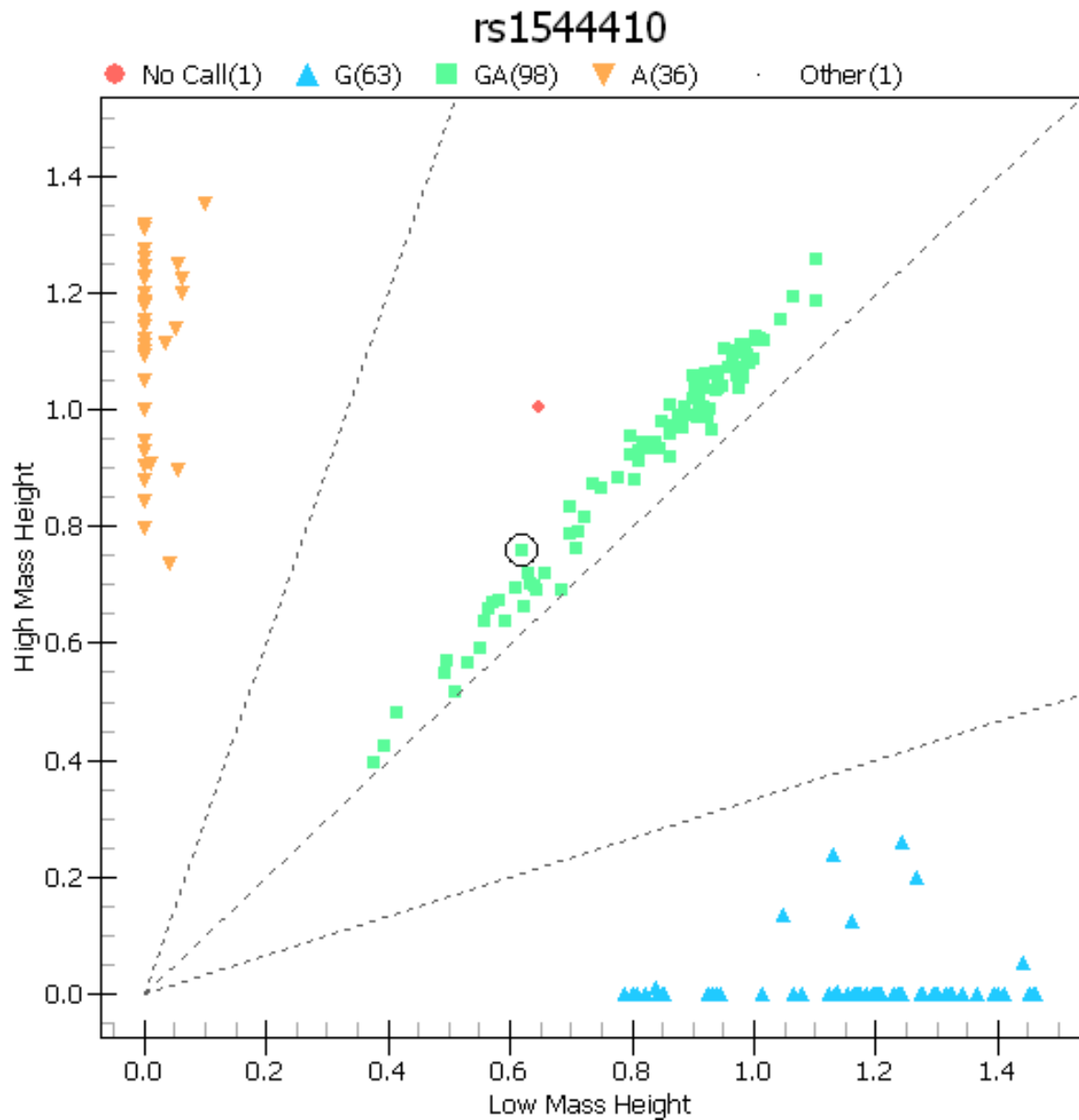


Figura 39. Representación gráfica de la distribución de los genotipos del rs1544410

	CTX i	P1NPi	25OHDi	PTHi
Bb	0,331 ± 0,12	61 ± 24	25 ± 9	37 ± 14
Bb	0,319 ± 0,15	61 ± 28	24 ± 9	36 ± 11
BB	0,307 ± 0,15	54 ± 16	21 ± 10	33 ± 16

Tabla 13. Valores iniciales y genotipo del SNP BsmI

Los valores iniciales no presentaban diferencias en función del genotipo

	Dif CTX	DifP1NP	Dif 25OHD	Dif PTH
bb	-0,037 ± 0,12	-11 ± 13	6 ± 5	-17 ± 14
Bb	-0,011 ± 0,08	-8 ± 18	8 ± 7	-16 ± 14
BB	-0,019 ± 0,12	-3 ± 1	7 ± 7	-14 ± 15

Tabla 14. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total

La respuesta de las mujeres a los suplementos no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

	DIFCTX			DIFP1NP			DIF25VITAMINA D			DIF PTH		
	Bb	Bb	BB	Bb	Bb	BB	bb	Bb	BB	bb	Bb	BB
A	-0,047 ± 0,10	-0,033 ± 0,15	-0,029 ± 0,06	-5 ± 8	-5 ± 17	-5 ± 8	4 ± 6	8 ± 8	5 ± 7	-17 ± 16	-22 ± 13	-9 ± 1
B	-0,016 ± 0,11	-0,019 ± 0,12	-0,031 ± 0,10	-12 ± 17	-9 ± 15	-4 ± 14	7 ± 6	7 ± 8	9 ± 6	-10 ± 11	-14 ± 13	-16 ±
C	-0,043 ± 0,13	-0,035 ± 0,09	-0,041 ± 0,09	-13 ± 11	-10 ± 22	-9 ± 6	6 ± 5	8 ± 7	7 ± 5	-21 ± 14	-9 ± 13	-20 ±

Tabla 15. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total dividida en función de los suplementos A radiación solar, B Ca+vit D, C Ca+ vit D +genisteina

La respuesta de las mujeres, divididas en función de los suplementos administrados, no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

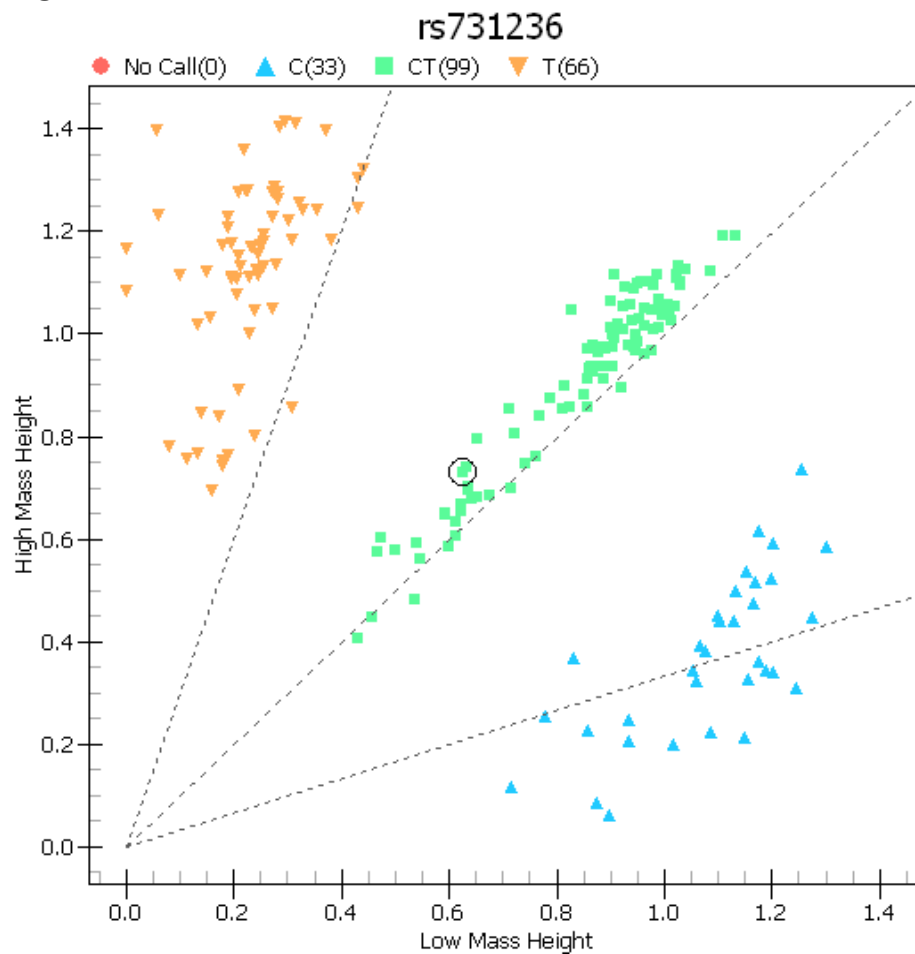
rs731236 (TaqI)

El cambio de base producido en este polimorfismo es C>T. Clásicamente los genotipos observados se han denominado TT, Tt y tt. En presencia del alelo T se asignaría alelo T y al alelo C le asignaríamos t. La distribución de los genotipos sería la siguiente:

- TT: 51 (35 %)
- Tt: 73 (49 %)
- tt: 24 (16 %)

La Figura 40 muestra la representación gráfica de estos porcentajes

Figura 40.



	CTX i	P1NPi	25OHDi	PTHi
TT	0,322 ± 0,13	59 ± 25	25 ± 9	37 ± 13
Tt	0,318 ± 0,15	61 ± 28	24 ± 9	36 ± 5
tt	0,314 ± 0,15	54 ± 16	22 ± 10	11 ± 5

Tabla 16. Valores iniciales y genotipo del SNP TaqI

Los valores iniciales no presentaban diferencias en función del genotipo

	Dif CTX	DifP1NP	Dif 25OHD	Dif PTH
TT	-0,032 ± 0,12	-11 ± 12	6 ± 5	-16 ± 14
Tt	-0,012 ± 0,13	-8 ± 18	8 ± 7	-15 ± 16
tt	-0,014 ± 0,09	-3 ± 11	7 ± 7	-16 ± 12

Tabla 17. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total

La respuesta de las mujeres a los suplementos no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

	DifCTX			DifP1NP			Dif25Vitamina D			Dif PTH		
	TT	Tt	tt	TT	Tt	tt	TT	Tt	tt	TT	Tt	tt
A	-0,049±0,10	-0,029±0,15	-0,037±0,06	-5±17	-6±8	-4±6	4±6	8±8	4±7	-18±15	-20±17	-13±9
B	-0,001±0,11	-0,028±0,12	-0,010±0,11	-11±16	-10±16	-4±14	8±6	7±7	9±6	-8±13	-15±12	-16±9
C	-0,044±0,13	-0,035±0,10	-0,012±0,12	-13±11	-10±22	-9±6	6±5	8±7	7±10	-21±14	-9±13	-20±18

Tabla 18. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total dividida en función de los suplementos, A radiación solar, B Ca+vit D, C Ca+ vit D +genisteina

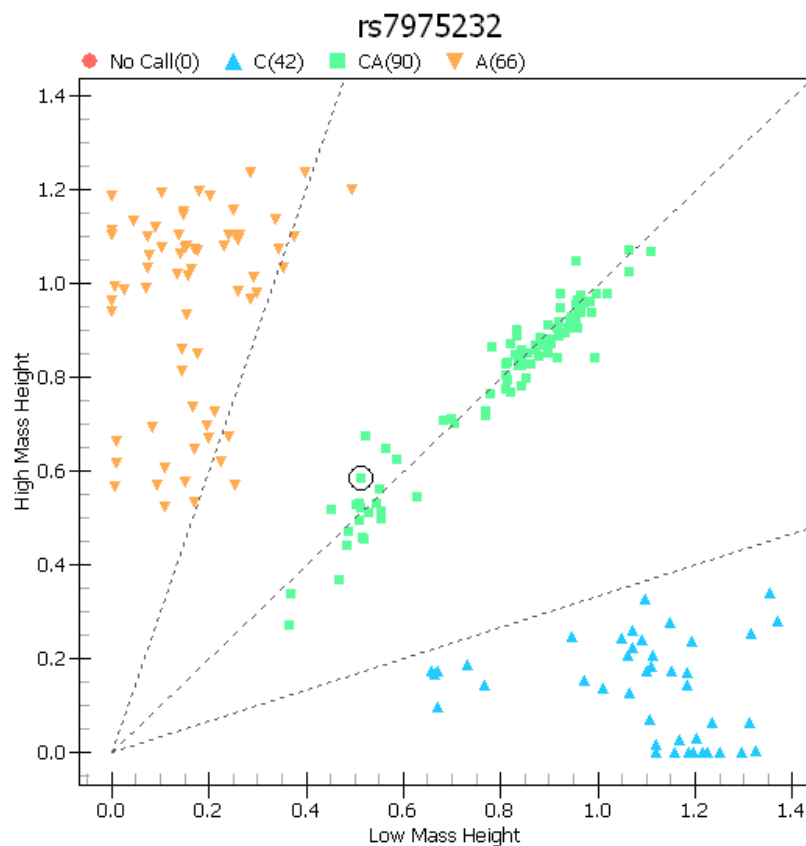
La respuesta de las mujeres, divididas en función de los suplementos administrados, no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

rs7975232 (Apal)

El cambio de base producido en este polimorfismo es C>T. Clásicamente los genotipos observados se han denominado AA, Aa y aa. En presencia del alelo A se asignaría alelo A y al alelo C le asignaríamos a. La distribución de los genotipos sería la siguiente:

- AA: 47 (32 %)
- Aa: 68 (46 %)
- aa: 33 (22 %)

La Figura 41 muestra la representación gráfica de estos porcentajes



	CTX i	P1NPi	25OHDi	PTHi
AA	0,328±0,16	58±19	23±10	35±13
Aa	0,311±0,15	60±28	24±10	36±13
aa	0,320±0,10	61±28	24±8	37±12

Tabla 19. Valores iniciales y genotipo del SNP TaqI

Los valores iniciales no presentaban diferencias en función del genotipo

	Dif CTX	DifP1NP	Dif 25OHD	Dif PTH
AA	-0,216±0,10	-7±11	6±7	-15±14
Aa	-0,009±0,14	-8±19	8±7	-15±15
aa	-0,037±0,12	-10±13	6±5	-18±13

Tabla 20. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total

La respuesta de las mujeres a los suplementos no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

Tabla 21. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los genotipos. Población total dividida en función de los suplementos

	DifCTX			DifP1NP			Dif25Vitamina D			Dif PTH		
	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
A	-0,025±0,12	-0,030±0,13	-0,07±0,10	-7±8	-4±18	-5±8	5±6	8±9	4±5	-15±17	-20±13	-20±1
B	-0,019±0,10	-0,015±0,13	-0,061±0,08	-5±14	-8±17	-13±20	7±7	8±7	6±7	-17±10	-10±13	-16±1
C	-0,02±0,07	-0,013±0,16	-0,005±0,08	-8±11	-13±21	-11±10	7±8	8±6	6±5	-15±16	-15±16	-18±1

La respuesta de las mujeres, divididas en función de los suplementos administrados, no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente.

HAPLOTIPOS

Se han identificado 4 haplotipos con las siguientes frecuencias:

- baT : n= 148 (48.5 %)
- BAT: n= 63 (21 %)
- Bat: n= 58 (19 %)
- bAT: n= 26 (8.5 %)

Los efectos sobre las distintas variables aparecen en las siguientes tablas

	CTX	P1NP	25OHD	PTHi
baT	0,321± 0,14	61±27	25±9	37± 13
BAT	0,332 ± 0,15	60 ± 20	25 ± 9	34 ± 13
Bat	0,299 ± 0,16	57 ± 28	21 ± 10 ^a	36 ± 14
bAT	0,323 ± 0,15	58±19	23 ± 8	35± 9

a) p= 0.038

Tabla 21. Valores iniciales y genotipo del los diferentes haplotipos

Los valores iniciales no presentaban diferencias en función de los haplotipos salvo el valor basal de vitamina D que es inferior en el haplotipo Bat

	DifCTX	DifP1NP	Dif25OHD	DifPTHi
baT	-0,026± 0,12	-9±15	7±7	-16± 14
BAT	-0,035± 0,10	-7 ± 11	7 ± 7	-16 ± 13
Bat	0,011 ± 0,13	-5 ± 19	8 ± 7	-15 ± 14
bAT	-0,011 ± 0,11	-10 ±10	7 ± 6	-13 ± 16

Tabla 22. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los haplotipos. Población total

La respuesta de las mujeres a los suplementos no dependía del haplotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del haplotipo presente.

		baT			BAT			
	Dif CTX	Dif P1NP	Dif 25OHD	Dif PTH	Dif CTX	Dif P1NP	Dif 25OHD	Dif PTH
A	-0,042± 0,12	-4 ± 14	6 ± 8	-20 ± 14	-0,053± 0,11	-8 ± 11	7 ± 9	-20± 14
B	-0,020± 0,12	-10± 17	7 ± 7	-12 ± 12	-0,041± 0,06	-7± 13	8± 7	-15± 11
C	-0,020± 0,13	-13± 15	7± 5	-18 ± 14	0,026 ± 0,10	-0.7± 10	4 ± 7	-5 ± 10

Tabla 23. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los haplotipos Población total dividida en función de los suplementos

		Bat				bAT		
	Dif CTX	Dif P1NP	Dif 25OHD	Dif PTH	Dif CTX	Dif P1NP	Dif 25OHD	Dif PTH
A	-0,002± 0,30	-0,8 ± 18	6 ± 7	-11 ± 14	-0,031± 0,14	-8 ± 7	7 ± 4	-20± 13
B	0,04± 0,15	-0,8± 19	8 ± 8	-16 ± 10	-0,01± 0,11	-11± 11	7± 8	-9± 16
C	-0,01 ± 0,10	-14± 19	10± 8	-17± 17	0,031 ± 0,08	-8± 11	7 ± 5	-13 ± 16

Tabla 24. Respuesta de los marcadores, vitamina D y PTH en función de los haplotipos Población total divide en función de los suplementos

La respuesta de las mujeres, divididas en función de los suplementos administrados, no dependía del genotipo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo presente. Al analizar los haplotipos se observó un comportamiento similar al obtenido con los genotipos. No hemos observado ninguna diferencia en función del haplotipo.

RESPONDEDORAS y NO RESPONDEDORAS

Las pacientes fueron divididos en dos grupos, respondedoras y no respondedoras en función de los mujeres que habían alcanzado unos niveles saludables de vitamina D para el hueso. El punto de corte establecido fue de 20 ng/ml que es considerado por diversos autores como un valor que permite una adecuada respuesta al tratamiento antiosteoporótico. El porcentaje de mujeres que inicialmente tenían niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml era de un 39 %. Tras la aplicación de los tres procedimientos nutricionales, el 11 % mantuvo niveles de vitamina D por debajo de 20 ng/ml. Estas 31 mujeres fueron considerados como no repondedoras. Se han analizado en función de los genotipos y de los haplotipos.

Bsml

	BB	bb	Bb
Respondedoras	19(12.5 %)	64(42 %)	43 (28 %)
No Respondedoras	3 (2%)	9 (6 %)	15 (10 %)

Tabla 24. Respondedoras y no respondedoras en función del SNP Bsml

TaqI

	TT	Tt	Tt
Respondedoras	45(30%)	63(41%)	18(12%)
No respondedoras	4(3%)	8(5%)	5(3%)

Tabla 25. Respondedoras y no respondedoras en función del SNP TaqI

Apal

	AA	Aa	aa
Respondedoras	38(25%)	59(39%)	29(19%)
No respondedoras	8(5%)	6(4%)	3(2%)

Tabla 26. Respondedoras y no respondedoras en función del SNP Apal

Las tables 24, 25 y 26 muestran los datos de mujeres respondedoras y no respondedoras en función de los genotipos de los tres SNPs valorados no observando diferencias estadísticamente significativas entre las mismas

Haplotipos

	baT	BAT	Bat	bAT
Respondedoras	130(86%)	58(38%)	41(27%)	22(14%)
No respondedoras	13(9%)	3(2%)	15 ^a (10%)	3(2%)

a) p= 0.001

Tabla 27. Respondedoras y no respondedoras en función del haplotipo

La tabla muestra que las mujeres con haplotipo Bat tiene una peor respuesta a los diferentes suplementos nutricionales empleados. La tasa de no respondedoras en este grupo era de un 27 % , muy superior a los otros grupos 5 %, 9 % y 12 % siendo la diferencia estadísticamente significativa. Al valorar los valores iniciales de vitamina D no había diferencias entre los respondedores y no respondedores en las mujeres con haplotipo Bat (21 ± 12 ng/ml vs 21 ± 7 ng/ml, $p= 0,987$). Esto significa que la mayor tasa de no respondedores no se debe a cifras iniciales de vitamina D inferiores. Incluso en otros haplotipos (baT y BAT) las mujeres no respondedoras presentaban cifras mas elevadas de vitamina D que las respondedoras, 29 ± 12 vs 24 ± 8 ng/ml, $p= 0,03$ en haplotipo baT y 30 ± 8 vs 23 ± 8 ng/ml, $p= 0,003$ en haplotipo BAT.

DISCUSIÓN

Deficiencia de vitamina D

Las mujeres con deficiencia de vitamina D, inferior a 20 ng/ml, fueron 49 lo que supone un porcentaje de un 39 %. Las mujeres con insuficiencia de vitamina D, inferior a 30 ng/ml, fueron 113 mujeres con un porcentaje del 75 %. Los datos de deficiencia son inferiores a los obtenidos por Aguado et al (60) que alcanzaban un 84 %, similares a los publicados por Mezquita et al (61) aunque este autor estableció un punto de corte de 15 ng/ml y superiores a los publicados por Mata et al (62) que con este nivel de vitamina D encontró un porcentaje del 18 %. Son comparables a otros datos observados en población española de mayor edad (64,67). Sin embargo, son claramente inferiores a los observados por Niño et al (69) en un estudio realizado en población anciana en nuestra área geográfica. Podemos concluir que en población joven existe una notable prevalencia de deficiencia de vitamina D siendo elevada los porcentajes de insuficiencia de vitamina D.

Nuestros resultados muestran que los tres procedimientos empleados para incrementar los niveles de vitamina D y reducir los de PTH han sido efectivos observándose un aumento de vitamina D y un descenso de PTH, ambos estadísticamente significativos. Esto ha tenido un reflejo sobre el remodelado óseo, disminuyendo CTX y P1NP tras tres meses de aplicación de los procedimientos comentados. Esto debe tener un efecto beneficioso sobre la densidad mineral ósea en los 6-12 meses siguientes. Nuestra hipótesis de un posible efecto aditivo de las isoflavonas no se ha confirmado. No existen diferencias en los cambios observados en las tres poblaciones analizadas. El estudio nutrigenético no ha mostrado diferencias ni en las valores basales ni tras la puesta en marcha del procedimiento terapéutico con los genotipos. Sin

embargo, se han observado diferencias con los haplotipos. Discutiremos los resultados en los diferentes aspectos comparándolo con los datos de la literatura más relevantes.

La principal fuente de vitamina D viene determinada por la exposición de la piel a la radiación ultravioleta en banda B (UVA 290-315 nm). La exposición ultravioleta depende de varios factores como la latitud, la nubosidad y la polución (144,145). La exposición ultravioleta desciende desde el ecuador hacia regiones polares creándose un gradiente de producción . En las latitudes más al norte por encima de los 40° , la generación de vitamina D en los meses de invierno, aunque la exposición solar sea adecuada, es baja. Hay que tener en cuenta que la latitud de Valladolid es de 41° . Se hipotetiza que ciclos anuales de hipovitaminosis D generarían un hiperparatiroidismo secundario leve que provocaría variaciones en el remodelado óseo y sería responsable de pérdida de masa ósea en población postmenopáusica y ancianos, así como no alcanzar el pico de masa ósea en jóvenes (146-148) .

Sin embargo, no todos los datos son concordantes en la literatura. Un análisis ecológico de metaregresión que incluyó 394 estudios con 33266 pacientes no encontró relación entre latitud y 25-hidroxicolecalciferol, tanto de forma cruda como tras ajustar por edad y sexo (149) . Pero se han publicado resultados dispares. Un estudio que incluyó individuos de 25 países de los 5 continentes encontró una relación positiva entre 25-hidroxicolecalciferol y latitud, $r=0.42$, $p= 0,01$ (150) . Otro estudio realizado en población anciana europea mostró una relación similar, con valores más bajos en el sur de Europa (151) . Sin embargo, otro estudio realizado en diferentes ciudades francesas con latitudes entre 43° y 51° , con una población homogénea, mostró una relación inversa entre latitud y vitamina D ($r= 0,72$, $p= 0,03$) (152) .

A pesar de estos datos en la literatura, tanto a nivel internacional como a nivel nacional, se han publicado diversos estudios donde se aprecia una variación estacional de la vitamina D y de la paratohormona, datos similares a los observados por nosotros en el grupo A donde el único procedimiento empleado para incrementar la vitamina D fue la radiación ultravioleta.

El estudio DECSI (German Health Interview and Examination Survey for Adults) analizó el estatus de vitamina D en población alemana cuya latitud media está más al norte que Valladolid. Se incluyeron 6995 individuos, 3635 mujeres y 3360 hombres. Se designaron 4 periodos, primavera (marzo a mayo), verano (junio a agosto), otoño (septiembre a noviembre) e invierno (diciembre a febrero). La deficiencia de vitamina D se observó en el 60 % de las mujeres entre 18 y 44 años y en el 69.9 % en las mujeres mayores de 65 años. Nuestro datos eran similares. Los niveles medios de vitamina D eran 18,36 ng/ml, cifras inferiores a las obtenidas por nosotros. En esta población se apreciaron diferencias en función de la estación del año en que se realizó la extracción. En primavera los valores de vitamina D eran 16,28 ng/ml frente a 23,48 en los meses de verano, con un incremento medio del 44 % (153). En nuestro caso el incremento de vitamina D fue del 26 %. Kull et al (154) estudiaron 367 sujetos, varones y mujeres, con unos niveles de vitamina D en invierno de $17,2 \pm 5.4$ ng/ml que se incrementó en verano a $23,7 \pm 7,1$ ng/ml, $p= 0.0001$, con un aumento del 30 %, similar al observado por nosotros. Además los autores encontraron una relación inversa entre PTH y vitamina D, estableciéndose un punto de corte de 32ng/ml a partir del cual se suprimiría la PTH.

Bhatton et al (155) realizaron un estudio de características similares en población húngara. Hungría se encuentra en una latitud de $47^{\circ} 29'25''$. Se incluyeron 319 individuos, objetivándose una prevalencia de hipovitaminosis D

que variaba en función de la estación, 71 % en primavera, 46,3 % en verano, 49,4 % en otoño y 56,7 % en invierno. Al igual que en nuestro estudio los niveles de vitamina D eran inferiores en aquellos meses con menos horas de sol. Los autores encontraron una relación positiva entre PTH y CTX que era estadísticamente significativa. En nuestro estudio no encontramos relación entre PTH y marcadores del remodelado óseo aunque si se observó un cambio estacional de los marcadores, de forma similar a un estudio alemán (147).

En población holandesa mayor de 65 años se analizaron las variaciones estacionales de la vitamina D (156) . Se incluyeron 2857 individuos observándose variaciones en el porcentaje de hipovitaminosis D en función de la estación analizada. En invierno y primavera se alcanzaba un porcentaje del 63 % que se reducía al 37 % en otoño y verano. Destacaba en este estudio que la población estudiada eran ancianos donde la producción cutánea de vitamina D está disminuida. Otro hecho curioso fue que los individuos que usaban cremas solares presentaban mayores incrementos de vitamina D. Es posible que estos individuos estuvieran en contacto con el sol durante más tiempo. Datos similares se han observado en otros estudios realizados en Suiza, Nueva Zelanda, Japon y Estados Unidos (157-160) .

Las variaciones estacionales de la vitamina D también se han obtenido en estudios realizados en zonas más próximas al ecuador. Levis S et al (161) analizaron en Florida (USA) 212 individuos, 77 hombres y 135 mujeres. En las mujeres la vitamina D aumentó de $22,4 \pm 8,2$ ng/ml frente a $25 \pm 9,4$ ng/ml, $p=0.0009$, con un incremento del 33 %. Florida es una región de baja latitud ($21^{\circ} 46'$).

En población española se han publicado numerosos estudios que valoraban la prevalencia de hipovitaminosis D. Sin embargo, son escasos los que analizan las

variaciones estacionales. Granado-Lorencio et al (162) , en un grupo de 644 mujeres osteoporóticas, con una edad media de 66 ± 11 años, observaron las variaciones estacionales de la vitamina D. La latitud de Madrid es $40^{\circ} 25'07''$, por encima de 40° . Se observaron niveles bajos de vitamina D en invierno ($24,8$ ng/ml con un rango entre $23,6$ ng/ml y $26,4$ ng/ml) y niveles más elevados en verano (32 ng/ml con un rango entre $25,6$ ng/ml y $38,8$ ng/ml). Los datos son similares a los observados en nuestro de estudio.

En 2001 se puso en marcha el “ Estudio de los cinco países “, estudio trasversal y observacional que tenía por objeto conocer el estatus de vitamina D en mujeres de cinco países europeos (Dinamarca, España, Finlandia, Irlanda y Polonia) teniendo en cuenta distintos hábitos y situaciones. Rodríguez-Sangrador et al (70) publicaron los datos de la población española. Estos autores observaron un incremento de la vitamina D en verano con respecto al invierno ($16,13 \pm 8,2$ ng/ml vs $12,03 \pm 6,96$ ng/ml, $p= 0,0001$) sin modificaciones en la paratohormona ($4,09 \pm 1,3$ vs $4,10 \pm 1,90$ ng/ml). Llama la atención la falta de descenso de la PTH y las cifras de vitamina D que eran muy bajas. En pacientes del estudio EVOS (European Vertebral Osteoporosis Study) recogidos en Asturias, situada a una latitud de 43° , se determinaron los niveles de vitamina D en un estudio longitudinal de un año de duración (67) . Se realizó una única determinación y se compararon los valores realizados en verano y en invierno con unos valores de $19,4 \pm 10,3$ ng/ml vs $13,7 \pm 6,8$ ng/ml, $p= 0.001$) mientras que los niveles de PTH eran inferiores (47 ± 20 pg/ml vs 55 ± 23 pg/ml, $p= 0,015$). La variación estacional de los niveles de vitamina D también fue observada en el estudio realizado por Olmos et al (163) a partir de la cohorte Camargo. Al igual que en esta tesis, observaron niveles más

elevados de vitamina D en verano-otoño, con diferencias estadísticamente significativas sobre el periodo invierno-primavera.

Los datos publicados en la literatura son concordantes con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Se ha observado un incremento de los niveles de vitamina D y un descenso de la PTH con un cambio estacional en los marcadores del remodelado óseo. En verano se observó una reducción del remodelado manifestado a través de un descenso de la CTX y de la P1NP.

Suplementos de calcio y vitamina D

La administración de suplementos de calcio (1000 mg/día) y vitamina D (800UI/día) incrementa los niveles de 25-hidroxicolecalciferol y desciende los niveles de PTH. A su vez reduce la concentración plasmática de CTX y P1NP siendo estadísticamente significativa únicamente con P1NP. Los resultados son comparables a los observados con la radiación ultravioleta, sin observar un efecto aditivo al añadir suplementos alimentarios. No se ha observado correlación entre los cambios de la PTH y los marcadores del remodelado óseo

La mayor parte de los estudios realizados para valorar el efecto de los suplementos de calcio y vitamina D sobre marcadores del remodelado óseo se han realizado en personas de edad avanzada y con un alto porcentaje de deficiencia/insuficiencia de vitamina D. En personas jóvenes o con menopausia reciente, como en nuestro caso, los estudios son escasos y con una gran variabilidad de resultados. Ello viene determinado por la heterogenicidad de las poblaciones estudiadas, la combinación de mujeres y varones, las dosis de vitamina D, el periodo del año donde se inicia el estudio y los tiempos de seguimiento.

Gallagher et al (164) analizaron en 163 mujeres postmenopáusicas no recientes, 7 años desde la última regla, con insuficiencia de vitamina D, el efecto de diferentes dosis de suplementos de vitamina D sobre la propia vitamina y la PTH. Es el primer estudio randomizado que plantea en esta población una forma de administración dosis dependiente. El periodo de seguimiento fue de un año, sin indicarse la estación del año donde cada paciente inicia el estudio. Las dosis de vitamina D oscilaban entre 400 UI/día y 4800UI/día acompañándose de la administración de calcio a dosis de 1200 mg-1400 mg/día. Se observó un incremento de la concentración plasmática de

vitamina D que era dosis dependiente aunque se alcanzaba un “plateau”. Dosis de 3200 UI/día conseguían el mayor incremento de concentración plasmática de vitamina D, de tal forma que dosis superiores no incrementaban las concentraciones. Con la paratohormona se observó un fenómeno especular, descendía la concentración plasmática de PTH en función de las dosis de vitamina D. Los autores concluían que suplementos de vitamina D de 800 UI/día conseguían niveles de vitamina D por encima de 20 ng/ml en el 97,5 % de las mujeres. Como hemos comentado previamente es el primer estudio randomizado, controlado con placebo, que analiza, de forma dosis dependiente, el efecto de suplementos de vitamina D. En nuestro estudio no se observó efecto aditivo de los suplementos sobre la radiación solar. Pudiera tener relación sobre el efecto plateau observado por estos autores. El incremento de las concentraciones plasmáticas de vitamina D pudiera activar la 24 hidroxilasa dando lugar a la formación del metabolito inactivo de la vitamina D (24,24, dihidroxicolecalciferol), mecanismo de seguridad para evitar la aparición de toxicidad por vitamina D. Los autores observan un descenso de la PTH con el incremento de los niveles de vitamina D, de forma similar a nuestro estudio. No se pueden comparar los resultados de los marcadores porque los autores no los midieron

Meir et al (147) valoraron , en un estudio con un tamaño muestral pequeño, el efecto, durante los meses de invierno, de suplementos de vitamina D sobre la prevalencia de insuficiencia de vitamina D, PTH plasmática y marcadores del remodelado óseo. El estudio se realizó en dos años. En el primero determinaron las variaciones estacionales de los parámetros anteriores y en el segundo el efecto de suplementos de calcio (500 mg/día) y vitamina D (500 UI /día). El estudio confirmó, al igual que en nuestros datos, que el

metabolismo óseo sigue un patrón estacional. El remodelado óseo estaba incrementado durante el invierno, coincidiendo con el nadir de la 25-OH-colecalciferol y la elevación de la PTH. Estos datos eran revertidos por la administración de suplementos de calcio y vitamina D. Nuestro estudio administró los suplementos durante los meses de verano ya que el objetivo era determinar si existía un componente aditivo con el efecto de la radiación ultravioleta. Es posible que los efectos de los suplementos estén en relación con el nivel previo de vitamina D y el grado de activación de osteoclastos. Si los niveles iniciales de vitamina D son elevados, el efecto de los suplementos es pobre.

Aloia et al (165,166) publicaron dos estudios de características similares. Uno inicial, con una población heterogénea y pequeña, que posteriormente se replicó en una población de mayor tamaño y formada exclusivamente por mujeres postmenopáusicas. El objetivo del estudio era valorar si el descenso de la PTH y los marcadores de remodelado estaba relacionado con los suplementos de calcio o con la vitamina D. Las mujeres se aleatorizaron en 4 grupos, placebo, calcio, vitamina D y calcio asociado a vitamina D. Antes de aleatorizar los grupos, a la población total, se le realizó una sobrecarga de calcio observándose un descenso de la PTH y marcadores del remodelado. Posteriormente, al aleatorizar los grupos, se observó que los suplementos de calcio provocan un descenso de PTH y de los marcadores de resorción mientras que los suplementos de vitamina incrementan la concentración plasmática de la misma y suprime la PTH pero no modifica los marcadores. El mayor efecto se conseguía con suplementos de calcio de 1200 mg/día. Los resultados fueron similares en ambos estudios.

Un estudio de características similares fue presentado por Trautvetter et al (167) en una población heterogénea, hombres y mujeres, con un tamaño muestral pequeño, 60 individuos. La edad media era de 42 ± 12 años, más jóvenes que en nuestro estudio, y recibían suplementos de vitamina D de 400 UI/día, la mitad de dosis empleada por nosotros. Se objetivó incremento de los niveles de vitamina D pero sin observarse descenso ni de la paratohormona ni de los marcadores del remodelado óseo de forma significativa. En Irlanda se han realizado dos estudios donde se valoró el efecto de los suplementos. Barnes et al (168) en una población pequeña, 30 individuos (15 mujeres y 15 varones), con una edad media de 21 años, analizaron el efecto de 600 UI/día de vitamina D y 1500 mg/día de calcio. Se consideró grupo placebo el que recibió exclusivamente calcio. Se incrementaron los niveles de vitamina D sin disminuir la PTH ni los marcadores. Seamans et al (169) estudiaron una población más amplia, 215 individuos, con edades comprendidas entre 20 y 40 años. Los suplementos de vitamina D fueron variables , 0, 200 UI/día, 400 UI/día y 600 UI/día. La ingesta media de calcio era de 976 mg/día. El estudio se realizó entre los meses de noviembre y abril, periodo con niveles más bajo de vitamina D. Todos los suplementos incrementaron los niveles plasmáticos de vitamina D sin observarse modificaciones en los marcadores del remodelado óseo y en la PTH. Posiblemente era debido a que los niveles de vitamina D, a pesar de los suplementos, no eran superiores a los iniciales. Se diferencia de nuestro estudio en el periodo de realización, junio a septiembre en nuestro caso frente a noviembre a abril y la dosis de vitamina D empleada, 800 UI en nuestro caso frente a 600 UI.

Resultados similares a los observados por nosotros se han obtenido en población asiática (170) donde la administración de 1200 mg/día de calcio y

400 UI/día de hidroxicolecalciferol, obtenidos a partir de leche fortificada, mostró un incremento de los niveles de vitamina D, con una reducción estadísticamente significativa de los porcentajes de insuficiencia, descenso de PTH y de marcadores del remodelado. En un estudio realizado en España, en 2005, con un diseño cruzado y 2 años de duración, se valoró el efecto de la administración de 800 UI/día de colecalciferol sobre la PTH. Se observó un incremento de los niveles de vitamina D y un descenso de la PTH que era estadísticamente significativa en el cuartil basal más bajo de vitamina D (171). Hunter et al (172) realizaron un curioso estudio con parejas de gemelos para tratar de obviar la influencia de factores genéticos. Completaron el ensayo 64 parejas. A uno de los individuos se le suplementó con 800 UI/día y el otro individuo de la pareja recibió placebo. Se observó un incremento estadísticamente significativo de la vitamina D, sin apreciarse cambios ni en la PTH ni en los marcadores del remodelado.

Como se ha descrito los estudios publicados en la literatura médica son escasos y con una metodología variable. Por ello, los resultados son discordantes dependiendo posiblemente de los valores basales de vitamina D y PTH y de la dosis de suplemento empleada.

Calcio, vitamina D e isoflavonas

La administración de suplementos de calcio, vitamina D e isoflavonas produce resultados superponibles a los obtenidos con la administración de calcio y vitamina D. Se observa un incremento de los niveles de vitamina D, con disminución de la PTH y un descenso de los marcadores del remodelado óseo. Todos estos cambios son estadísticamente significativos excepto la disminución de CTX que muestra una tendencia. Los datos indican que añadir isoflavona no tiene un efecto beneficioso sobre la salud ósea de mujeres sanas con menopausia reciente. Los datos son comparables a los publicados en la literatura, como describiremos a continuación, aunque sucede algo similar a lo comentado con los suplementos de calcio y vitamina D. Los estudios son de baja calidad, con un tamaño muestral pequeño y dosis diferentes de isoflavonas y de suplementos de calcio y vitamina D añadidos. Los primeros ensayos clínicos, de buena calidad metodológica, se realizaron a finales del siglo XX y principios del siglo XXI donde se valoró el efecto de una isoflavona sintética, la ipriflavona. Los primeros estudios añadían calcio en dosis variable a la ipriflavona. Ohta et al (173) en 60 mujeres postmenopáusicas con osteopenia u osteoporosis analizaron el efecto de 600 mg/día de ipriflavona o calcio sobre masa ósea y marcadores observando una reducción de un marcador de resorción, deoxipiridinolina. Este mismo dato había sido observado previamente (174) en un estudio con un tamaño muestral más amplio, 453 mujeres postmenopáusicas y suplementos de calcio de 1 gr /día, sin incluir vitamina D en este caso. En el año 2001 se publicó en JAMA (123) un estudio que incluyó 474 mujeres postmenopáusicas con

edades comprendidas entre los 45 y 75 años que fueron aleatorizadas a placebo (500 mg calcio/día) o ipriflavona (200mg/8 h y 500 mg/día de calcio). El estudio tuvo una duración de 36 meses no observándose cambios en la densidad mineral ósea ni en los marcadores valorados (deoxipiridinolina y crosslaps urinarios).

Posteriormente se han publicado dos estudios donde se valoró el efecto de suplementos nutricionales ricos en soja sobre marcadores del remodelado. Dalais et al (175) analizaron 116 mujeres durante un periodo de tres meses, únicamente 78 completaron el ensayo. No se observaron diferencias en las concentraciones urinarias de piridinolina y deoxipiridinolina. En el estudio Menfis (176) donde se incluyeron 187 mujeres asintomáticas, postmenopáusicas , con un rango de edad entre 36 y 90 años, la dieta rica en soja no modificó los niveles de marcadores de resorción. Ninguno de los estudios comentados incluyó determinaciones de 25-hidroxicolecalciferol ni de paratohormona.

Atteritano et al (177) plantearon un estudio, aleatorizado, randomizado que tenía como objetivo principal determinar el efecto de genisteína a dosis de 54 mg/día sobre predadores de riesgo vascular en mujeres postmenopáusicas con un seguimiento de 12 meses. Todas ellas recibieron suplementos de calcio (500 mg/día) y vitamina D (500 UI/día). Dosis inferiores a las empleadas por nosotros. Se incluyeron 198 mujeres en el grupo de genistéina y 191 en el grupo placebo. Como objetivo secundario se valoraron los cambios de osteoprotegerina (OPG) , bloqueante endógeno de RANKL, principal responsable de la resorción ósea. La genisteina conseguía incrementar los niveles de OPG entre un 6 y 7 % al año y a los dos años, observándose una relación estadísticamente significativa entre niveles plasmáticos de genistéina y

OPG ($r: 0,219, p= 0,0001$). Esto sugiere que se necesitan niveles plasmáticos elevados de isoflavona para que tengan efecto en reducir el remodelado óseo. En un estudio cuyo objetivo era valorar la seguridad de las isoflavonas sobre la mama, a los 36 meses, se determinó su efecto sobre la densidad mineral ósea y marcadores. En el tercer año había 138 mujeres incluidas, 67 en el grupo placebo y 71 en el grupo de genisteína a dosis de 54 mg/día. Los dos grupos recibían suplementos de calcio y vitamina D como en nuestro ensayo. Se observó un incremento estadísticamente significativo de la densidad mineral ósea en columna lumbar y cuello femoral a los 2 y 3 años , con un perfil favorable de los marcadores (178) . Estaban aumentados fosfatasa alcalina ósea, osteoprotegerina e IGF-I y disminuidos CTX y RANKL. En ningún momento se aportaron datos de niveles de vitamina ni de PTH. El estudio PHYTOS (126) se realizó en países europeos , con un seguimiento de un año, incluyendo mujeres con menopausia reciente, de forma similar a la nuestra. El periodo de seguimiento fue más largo, 12 meses, incluyéndose 110 mujeres que se aleatorizaron a isoflavona aglicona. No recibieron suplementos de calcio ni de vitamina D. Los resultados mostraron un descenso de la masa ósea en ambos grupos sin apreciarse cambios en los marcadores y en la PTH. Un estudio de características similares se realizó en mujeres de edad con resultados similares, no se modificaba la masa ósea ni los marcadores. Tampoco en este caso las mujeres recibieron suplementos de calcio y vitamina D (179) .

Un estudio, con un tamaño muestral mayor, fue realizado por Wong et al (180) . Se llevó a cabo en Estados Unidos incluyendo 403 mujeres postmenopáusicas, con menopausia reciente, menos de 7 años, que fueron aleatorizadas a tres grupos, isoflavona 80 mg, isoflavona 120 mg y placebo. Todas ellas recibieron suplementos de calcio, 1000 mg/día, y vitamina D. La

duración fue de 2 años, empleándose como marcadores la osteocalcina y NTX. No se observaron diferencias entre las pacientes que recibieron isoflavonas, calcio y vitamina D y las únicamente ingirieron calcio y vitamina D. Son resultados similares a los encontrados por nosotros. Alekel et al (181) incluyeron 255 mujeres postmenopáusicas, con una edad de 54 años, que fueron aleatorizadas a isoflavonas (80 mg y 120 mg) o placebo. Todas las mujeres fueron suplementadas con calcio y vitamina D. El estudio tuvo una duración similar al nuestro, tres meses y como marcadores utilizaron CTX y fosfatasa alcalina ósea. En este caso tampoco se observaron cambios en los marcadores aunque tras la realización de diferentes ajustes se observó una menor pérdida de masa ósea a nivel de cuello femoral en las mujeres que recibieron 120 mg/día de isoflavonas.

En el año 2013 se ha publicado un estudio con mujeres postmenopáusicas recientes con una duración de 6 meses. Todos los individuos del estudio recibieron calcio a dosis de 500 mg/día. El grupo de intervención fue tratado con genisteína a 30 mg/día y 800 UI de vitamina D. La dosis de esta última era similar a la nuestra pero la de genisteína era muy inferior al igual que el calcio (500 mg vs 1000 mg). El tamaño muestral era pequeño (70) y el periodo de inclusión no fue uniforme por lo que no se eliminó el riesgo de estacionalidad. Se analizó el efecto sobre marcadores, vitamina D, PTH y densidad mineral ósea. La densidad mineral ósea lumbar no mostró diferencias entre grupos mientras que en cuello femoral el grupo tratado con vitamina D e isoflavonas mantuvo la masa ósea. El grupo placebo presentó una pérdida del 1,2 %. Los marcadores tuvieron un comportamiento paradójico. Se observó un incremento de la fosfatasa alcalina ósea a los tres meses e incremento de NTX, marcador de resorción, a los 6 meses. Otros marcadores como osteocalcina y

deoxipiridinolina no mostraron cambios. Los datos de la vitamina D y la PTH eran similares a los nuestros. Se incremento la vitamina D, disminuyó la PTH observándose una correlación bivariada inversa entre ambos ($r: -0,43, p=0,00001$) (182) . Este efecto puede explicarse por los suplementos de vitamina D y no por la isoflavona, son datos similares a los observados por nosotros. En población danesa y en un estudio de tamaño muestral pequeño (60 individuos), la administración de 150 ml de un extracto de trébol rojo, rico en isoflavonas, producía un descenso de CTX de un 4,93 % que no era estadísticamente significativo. La cantidad de isoflavona que se administraba era de 37,8 mg/día (183) . El grupo de Muñoz-Torres realizó un estudio aleatorizado, controlado, doble ciego con 99 mujeres postmenopáusicas. Se administraron productos lácteos con y sin suplementos de soja. Se observó un descenso de un marcador de resorción, FART, de osteoprotegerina y un aumento de los niveles de 25-OH-vitamina D pero sin apreciarse diferencias entre ambos grupos aunque en las mujeres que recibieron suplementos de soja se apreció un incremento de la masa ósea por ultrasonidos (184) .

También se ha valorado en varones el efecto de suplementos nutricionales de soja sobre marcadores del remodelado óseo e IGF-I. A todos los individuos se les suplementó con calcio (1000 mg/día) y vitamina D (200 UI/día). El estudio duró tres meses, no observándose cambios en los marcadores de formación y resorción. Únicamente, aquellos individuos que recibían suplementos tenían niveles más elevados de de IGF-I, proteína relacionada con la formación ósea (185) .

La mayoría de los estudios presentados no muestran un efecto beneficioso sobre los marcadores del remodelado óseo o si lo presentan es débil. Muy probablemente este beneficio viene determinado por los suplementos de

calcio y vitamina D. No se observa en la literatura ni en nuestro estudio un efecto aditivo de las isoflavonas al ser añadidas a calcio y vitamina D. Es posible que tengan un efecto beneficioso débil pero no superior a la vitamina D y al calcio.

NUTRIGENÉTICA

La expresión de los diferentes genotipos era similar a la descrita en población española aunque no todos los estudios publicados analizaron los SNPs valorados por nosotros (186-191). No hemos observado relación entre marcadores del remodelado óseo y la expresión de los diferentes polimorfismos. Datos similares a los publicados por otros autores (188,189) Tampoco se han apreciado diferencias en la respuesta a los suplementos. En cuanto a haplotipos no hemos encontrado ningún trabajo en población española que analice la respuesta a los suplementos en función de los haplotipos.

Los estudios que valoran la nutrigenética de los suplementos de vitamina D, con respecto al receptor de la misma, son heterogéneos en su diseño. No son numerosos, los niveles iniciales de vitamina D son variables y analizan diferentes genotipos. Hay publicados un mayor número de estudios que valoran el efecto de genotipos del receptor de la vitamina D sobre masa ósea y fracturas.

Barry et al (192) estudiaron en una población muy amplia (1887 individuos), de población blanca, hombres y mujeres, no hispanas, el efecto de suplementos de calcio (1000 mg/día) y vitamina D (1000 UI/día) sobre los niveles de vitamina D en función de la presencia de diferentes SNPs. El seguimiento fue de un año por lo que no había variaciones estacionales, incluyéndose un grupo placebo. Analizaron 41 SNPs relacionados con vías metabólicas de la vitamina D y calcio. Se incluyeron 9 SNPs del receptor de la vitamina D pero únicamente coincidió con los escogidos por nosotros el rs7975232. No observaron cambios con este SNP al igual que sucedió con nosotros. De todos los SNPs del receptor de la vitamina D únicamente el

rs7968585 se ha asociado a incrementos de los niveles de vitamina D tras los suplementos. Sin embargo, la significación estadística desaparecía al ajustar por la adherencia al tratamiento. Al igual que sucedió en nuestro estudio ninguno de los los SNPs estaban relacionados con los niveles basales de vitamina D. Los SNPs de la vía metabólica GC, de la CYP2R1 y de la CYP24A1 determinaban los niveles iniciales de vitamina D. Estos resultados coinciden con un reciente estudio de GWAS publicado en Lancet (103).

Elnenaï et al (193) valoraron en un estudio de casos-controles, de tres meses de duración, en mujeres postmenopáusicas, osteopénicas u osteoporóticas, el efecto de suplementos de calcio (1200 mg/día) y vitamina D (800 UI/día) sobre la vitamina D. Se incluyeron menos pacientes que en nuestro estudio (46 mujeres) siendo divididas en dos grupos, respondedoras y no respondedoras, en función de la respuesta de la PTH. Nosotros dividimos a las mujeres en dos grupos, respondedores y no respondedores, en función de la respuesta de la vitamina D. Consideramos respondedoras aquellas que alcanzaban niveles de vitamina D por encima de 20 mg/ml. Los autores encontraron diferente expresión de polimorfismos de FokI en los respondedoras y no respondedoras. En otros polimorfismos, BsmI y TaqI, no se objetivaron diferencias. En mujeres afroamericanas postmenopáusicas, Nieves et al (194) encontraron que las mujeres que no respondían a suplementos de vitamina D, medido por supresión de PTH, presentaban un mayor porcentaje de genotipo mutante de folk. En adolescentes, se observó una menor absorción de calcio en los portadores de este genotipo (195) . Gennari et al (196) en población europea, encontraron una menor absorción intestinal de calcio en la población con genotipo BB (SNP BsmI) y genotipo tt (SNP TaqI) .

Los estudios de nutrigenética con suplementos de soja son escasos. Serrano et al (197) en un estudio cuyo objetivo primario era valorar el efecto de suplementos de soja y vitamina D sobre el perfil de riesgo vascular-analizaron la población total y posteriormente lo dividía en función del enzima de restricción BsmI del receptor de la vitamina D. Al analizar la población total observaron que los incrementos de vitamina D estaban relacionados con la dosis de la misma sin desempeñar ningún papel los suplementos de soja. La soja no tenían ningún efecto aditivo de forma similar a nuestro estudio. Estos autores observaron diferente respuesta en función de los polimorfismos del receptor de la vitamina D. El alelo G se asoció a un mayor incremento de 25-hidroxicolecalciferol y de 1,25-hidroxicolecalciferol. Estos resultados difieren de los nuestros ya que no encontramos ninguna relación entre el genotipo BsmI y cambios en los niveles de vitamina D.

Los polimorfismos analizados se localizaban en la región codificante 3'UTR. Se han descrito varios polimorfismos de tipo RFLP como BsmI, ApaI, TaqI que están muy próximos entre si. Por ello, parece razonable que los SNPs de los diferentes polimorfismos pudieran transmitirse juntos. Por ello, la determinación de haplotipos puede ser importante. Esta región, como se ha comentado previamente, está relacionada con la estabilidad del ARNm y como consecuencia con el nivel de expresión de VDR. En los datos publicados en la literatura hay pocos estudios que analicen el papel de los haplotipos y, en la mayor parte de los casos, tratan de relacionarlos con la densidad mineral ósea. Bustamante et al (190) no encontraron relación con la DMO empleando HAPLOWIEW y el software HAPLO.SCORE. Zambrano- Morales et al (198) encontraron que el haplotipo BBAAtt se asoció a un mayor riesgo de osteoporosis mientras que el haplotipo BbaaTT era un factor protector. Sin

embargo, estos autores no indicaban la metodología empleada para calcular los haplotipos. En un estudio realizado en varones de población sueca y asiática (MrOs) se observó que haplotipos del receptor de la vitamina D se asociaba a un incremento del riesgo de fractura vertebral en población sueca y a un descenso de DMO en población sueca y asiática (199). En pacientes EPOC, con predominio de varones, los haplotipos TAG (bAT) y TCG (baT) incrementaban el riesgo de osteoporosis (200). El haplotipo TCG (bAT) es el más prevalente en nuestra población aunque no encontramos ninguna relación con vitamina D, PTH, marcadores del remodelado y respuesta a los suplementos. En un estudio realizado en mujeres mejicanas (201) se encontró una asociación entre el haplotipo CGGT y riesgo de osteoporosis. Este haplotipo, a diferencia del analizado por nosotros, analizó 4 SNPS. Se incluyó el polimorfismo FokI, además de los tres analizados por nosotros.

En nuestro estudio se encontró que el haplotipo Bat (CAA) presentaba niveles basales inferiores de vitamina D y además, presentaba un menor número de mujeres respondedoras tras la administración de suplementos o el efecto de la radiación ultravioleta. En la revisión realizada únicamente hemos encontrado un trabajo que valora la relación entre haplotipos y valores basales de vitamina D. Es un estudio realizado en Brasil en un población de niñas con una edad media de 13 años (202). La determinación de vitamina D se realizó en meses de invierno y verano y la metodología empleada para la determinación de haplotipos era similar a la nuestra. Los autores encontraron una relación entre los tres SNPs (BsmI, ApaI, TaqI) y los niveles de vitamina D, hecho no observado en esta tesis y el haplotipo baT (TCG), el más prevalente en nuestro estudio, se asoció a niveles basales menores de vitamina D.

Limitaciones y Fortalezas del estudio

El estudio presentado tiene posiblemente dos limitaciones, la ausencia de medición de la densidad mineral ósea y el pequeño tamaño muestral en el estudio nutrigenético. La densitometría habría permitido determinar la prevalencia de osteoporosis en este grupo y su relación con los niveles de vitamina D, genotipos y haplotipos. El tamaño muestral es adecuado para el ensayo clínico pero es pequeño para el estudio genético que precisa de un número superior de individuos

La fortaleza del estudio radica en la homogeneidad de la población analizada, así como en su diseño metodológico. Proviene de una misma área geográfica, se ha utilizado un mismo laboratorio para realizar las determinaciones analíticas, en la misma época del año, y el número de investigadores ha sido limitado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de hipovitaminosis D en una población formada por mujeres con menopausia reciente es elevada, 39 % con deficiencia y 75 % con insuficiencia
2. La radiación ultravioleta consigue incrementar los niveles de vitamina D, reducir la paratohormona y los marcadores del remodelado óseo
3. Los suplementos de calcio-vitamina D y calcio-vitaminaD-isoflavona no incrementan los niveles de vitamina D en relación a la radiación ultravioleta durante el periodo del año de mayor intensidad de la misma
4. Las isoflavonas no tienen un efecto aditivo beneficioso en relación al calcio-vitamina D en el aumento de los niveles de vitamina D, reducción de la paratohormona y descenso de los marcadores del remodelado óseo
5. Los genotipos del receptor de la vitamina D (Bsm1, Apal, Taql) no influyen en los niveles basales de vitamina D, PTH y marcadores del remodelado óseo ni en la respuesta de los mismos a los tres procedimientos empleados, radiación ultravioleta, suplementos de calcio-vitamina D y suplementos de calcio-vitamina D-isoflavonas
6. El haplotipo Bat se asocia a niveles basales inferiores de vitamina D y una menor tasa de respondedores con los tres procedimientos empleados por lo que podría ser un haplotipo de riesgo para la osteoporosis

BIBLIOGRAFÍA

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. Prevention, diagnosis and therapy. JAMA 2001; 285: 785-795
2. World Health Organization. Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical report series. Ginebra. Suiza 1994
3. Diaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL et al. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. Med Clin (Barc) 2001; 116: 86-88
4. Diaz Curiel M, Carrasco de la Peña JL, Honorato Perez J, Pérez Cano R, Rapado A, Ruiz Martinez I. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. Multicentre Research Project on Osteoporosis. Osteoporos Int 1997; 7: 59-64
5. Melton LJ 3rd. How many women have osteoporosis now? J Bone Miner Res 1995; 10: 175-177
6. Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC Jr et al. Prevalence of low femoral bone density in older US adults from NHANES III. J Bone Miner Res 1997; 12: 1761-1768
7. Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M et al. Incidence of vertebral fracture in Europe: results from European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). J Bone Miner Res 2002; 17: 716-724
8. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. Osteoporos Int 2005; 16 (Suppl 2): S3-S7

9. Center JR, Nguyen TV, Schneider N, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporosis fracture in men and women: an observational study. *Lancet* 1999; 353: 878-882
10. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int* 2000; 11: 556-561
11. Del Pino Montes J. Coste de la osteoporosis postmenopáusica. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2012; 4 (Supl 1) 17-21
12. Sims NA, Martin TJ. Coupling activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the Basic Multicellular Unit. *Bonekey Rep* 2014; 3 : 481
13. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocr Rev* 2013; 34: 658-690
14. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 499-505
15. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42: 606-615
16. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292: 490-495
17. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology. Implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev* 2011; 32: 31-63

18. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 139-146
19. Castañeda S, Arboleya L. Osteoclastos: mucho más que células remodeladas de hueso *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014 ; 6: 109-121
20. Long F. Building Strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Mol Cell Biol* 2012; 13: 27-38
21. Yamaguchi A, Komari T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehofs and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21: 393-411
22. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007; 13: 791-801
23. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 289-302
24. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation. An update. *Gene* 2012; 498: 1-4
25. Rosini M, Gatti D, Adami S. Involvement of wnt/beta-catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2013; 93: 121-132
26. Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 2009; 27: 265-271
27. Baron R, Rawadi G. Minireview: Targeting the Wnt/Beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 207; 148: 2635-2643
28. Raisz LA. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3318-3325

29. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 142: 155-170
30. Ross FP. Interleukin 7 and estrogen-induced bone loss. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 147-149
31. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005; 208: 151-168
32. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055
33. Martinez J, Olmos JM, Hernandez JL et al. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women. The Camargo Cohort Study. *Clin Chim Acta* 2009; 409: 70-74
34. Guañabens N, Peris P, Monagal A. Bone turnover markers: a clinical review. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2015; 13: 83-97
35. Vasikarans S, Eastell R, Bruyere O et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for International references standards. *Osteoporos Int* 2011; 22: 391-420
36. Potts JT, Jüppner H. Disorders of parathyroid gland and calcium homeostasis. *Harrison's Internal Medicine* 19 Edth. McGrawhill 2015: 2466-2488
37. IOM (Institute of Medicine). Dietary referente intakes for calcium and vitamina D. National Academic Press 2011
38. Rizzoli R. Nutritional aspects of bone health. *Best Pract Res Clin End Metab* 2014; 28: 795-808

39. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour JP. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: Interaction with age, dietary calcium and 3'-end polymorphisms. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 925-930
40. Tai V, Leung W, Grey A, Reid IR, Bolland MJ. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2015 doi 10.1136/bmj.h4183
41. Manios Y, Moschonis G, Trovas G et al. Changes in biochemical indexes of bone metabolism and bone mineral density after a 12-mo dietary intervention program: the Postmenopausal Health Study. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 781-789
42. Bonjour JP, Benoit V, Pourchaire O et al. Inhibition of markers of bone resorption by consumption of vitamin D and calcium-fortified soft plain cheese by institutionalized elderly women. *Br J Nutr* 2009; 102: 962-966
43. Bonjour JP, Benoit V, Payen F et al. Consumption of yogurts fortified in vitamin D and calcium reduces serum parathyroid hormone and markers of bone resorption: a double-blind randomized controlled trial in institutionalized elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2915-2921
44. Kruger MC, Schollum LM, Kuhn-Sherlock B et al. The effects of a fortified milk drink on vitamin D status and bone turnover in post-menopausal women from South East Asia. *Bone* 2010; 46: 759-767
45. Dolphi B, Scholz-Ahrens KE, de Vrese M et al. Short-term effect of bedtime consumption of fermented milk supplemented with calcium, inulin-type fructans and caseinphosphopeptides on bone metabolism in healthy, postmenopausal women. *Eur J Nutr* 2009; 48: 45-53

46. Bolland MJ, Leung W, Tai V et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ* 2015; doi 10.1136/bmj.h4380
47. Khan B, Nowson CA, Daly RM et al. Higher dietary calcium intakes are associated with reduced risk of fractures, cardiovascular events and mortality: a prospective cohort study of older men and women. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 1758-1766
48. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med* 1992; 327: 1637-1642
49. Suda T, Masuyama R, Bouillon R, Carmeliet G. Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies. *Cur Op Pharmacol* 2015; 22: 87-89
50. Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, Deluca HF. CYP2R1 is a major but not exclusive contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 15650-15655
51. Deluca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* 2014; 3: 8-15
52. Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 276-280
53. Hagenau T, Vest R, Gissel TN et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: and ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* 2009; 20: 133-140
54. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 50-60

55. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T et al. Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology* 2013; 154: 1008-1020
56. Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM et al. Vitamin D action and regulation of bone remodeling: supresión of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1618-1626
57. Lieben L, Carmeliet G. Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* 2013; 54: 237-243
58. Perez-Castrillón JL, Gomez Alonso C. Métodos de determinación de la vitamina D y valores de normalidad. *REEMO* 2005; Supl 1: S12-S16
59. El-Hajj Fuleihen G, Bouillon R, Clarke B et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels: variability, knowledge gaps and the concept of a desirable range. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 1109-1113
60. Aguado P, Del Campo MT, Garces MV et al. Low vitamin D levels in outpatient postmenopausal women from a rheumatology clinic in Madrid, Spain: Their relationship with bone mineral density. *Osteoporos Int* 2000; 11: 739-744
61. Mezquita P, Muñoz Torres M, López Rodríguez F et al. Elevada prevalencia de deficit de vitamina D en poblaciones con riesgo de osteoporosis: un factor relevante en la integridad ósea. *Med Clin (Barc)* 2002; 119: 85-89
62. Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gomez JM. Inappropriate serum levels of retinol, α -tocoferol, 25-hydroxyvitamin D3 and 24,25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem* 2008; 41: 676-680

63. Quesada JM, Jens I, Benito P, Jimenez JA, Bouillon R. Vitamin D status of elderly people in Spain. *Age Ageing* 1989; 18: 392-397
64. Castillo Suarez M, Sosa Henriquez M. Influencia del grado de movilidad y de exposición al sol sobre los marcadores bioquímicos de remodelado en una población institucionalizada de la Isla de Gran Canaria. *REEMO* 1998; 7: 4-9
65. Gonzalez-Clemente JM, Martinez Osaba JM, Miñarro M, Delgado MP, Maurico D, Ribera F. Hipovitaminosis D: alta prevalencia en ancianos de Barcelona atendidos ambulatoriamente. Factores asociados. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 641-645
66. Larrosa M, Gratacos J, Vaqueiro M, Prat M, Campos F, Roque M. Prevalencia de hipovitaminosis D en una población anciana institucionalizada. Valoración del tratamiento sustitutivo. *Med Clin (Barc)* 2001; 117: 611-614
67. Gomez-Alonso C, Naves-Diaz ML, Fernandez-Martín JL, Diaz-López JB, Fernandez-Coto MT, Cannata-Andía JB. Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels. *Kidney Int* 2003; 63 (Suppl 85): 544-548
68. Vaqueiro M, Bate M, Anton E et al. Hipovitaminosis D asociada a exposición solar en la población mayor de 64 años. *Med Clin (Barc)* 2007; 129: 287-289
69. Niño V, Pérez Castrillón JL. Niveles de vitamina D en población mayor de 65 años. *REEMO* 2008; 17: 1-4
70. Rodriguez-Sangrador M, Beltran de Miguel B, Quintanilla Murillas L, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O. Contribución de la dieta y de la exposición solar al estatus nutricional de vitamina D en españolas de edad avanzadas. Estudio de los 5 países (Proyecto OPTIFORD). *Nutr Hosp* 2008; 23: 567-576

71. Martín Portela ML, Mónica A, Barahona A, Duprez H, Gonzalez-Chaves MS, Zeni SN. Comparative 25-OH-vitamin D level institutionalized women older than 65 years from two cities in Spain and Argentina having a similar solar radiation index. *Nutrition* 2010; 26: 283-286
72. Martinez ME, Del Campo MT, García JA et al. Niveles de vitamina D en pacientes con fractura de cadera en Madrid. *Med Clin (Barc)* 1996; 106: 41-44
73. Cauley JA, Lacroix HZ, Wu L et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann Intern Med* 2008; 149: 242-250
74. Cauley JA, Parimi N, Ensrud KE et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the risk of hip and nonspine fractures in older men. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 545-553
75. Cauley JA, Danielson ME, Boudreau R et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and clinical fracture risk in a multiethnic cohorte of women: The Women Health Initiative (WHI). *J Bone Miner Res* 2011; 26: 2378-2388
76. Roux C, Briot K, Horlait S, Varbanov A, Watts NB, Boonen S. Assessment of non-vertebral fracture risk in postmenopausal women. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 931-935
77. Dawson-Hughes B, Harris SS, Kroll EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997; 337: 670-676
78. Padimitropoulos E, Wells G, Shea B et al. Meta-analysis of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev* 2002; 23: 560-569

79. Jackson RD, Lacroix AZ, Gass M et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006; 354: 669-683
80. Bischoff HA, Stähelin HB, Dick W et al. Effects of vitamin D and calcium supplementation on falls: A randomized controlled trial. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 343-351
81. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav Es et al. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged > or = 60 y. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 752-758
82. Bruyere O, Cavalier E, Souberbielle JC et al. Effects of vitamin D in the elderly population: current status and perspectives. *Arch Public Health* 2014; 72: 32
83. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW. Vitamin D and muscle function. *Osteoporos Int* 2002; 13: 187-194
84. Bischoff-Ferrari HA, Willet WC, Wong JB. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009; 169: 551-561
85. Bischoff-Ferrari HA, Willet WC, Orav EJ et al. A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med* 2012; 367: 40-49
86. Cranny A, Horsley T, O'Donnell S et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health 2007; <http://archive.ahrg.gov>
87. Porthouse J, Cockagre S, King C et al. Patient level pooled analysis of 68500 patients from severe major vitamin D fracture trials in US and Europe. *BMJ* 2010

88. Bolland MJ, Grey A, Gamble GD, Reid IR. The effect of vitamin D supplementation on skeletal, vascular or cancer outcomes: a trial sequential meta-analysis. *Lancet Diab Endocrinol* 2014; 2: 307-320
89. Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HD, Vanderschueren D, Haentjens P. Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1415-1423
90. Long MD, Sucheston-Campbell LE, Campbell MJ. Vitamin D receptor and RXR receptor in the postgenomic era. *J Cell Physiol* 2015; 230: 758-766
91. Brown AJ, Dusso A. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999; 277: F157-F175
92. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leuw JPT. Genetic and biology of vitamin D receptor polymorphisms gene. *Gene* 2004; 338: 143-156
93. Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphism and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; 44: 235-241
94. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GC. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3643-3651
95. Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel M et al. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin 6 polymorphism and cardiovascular risk factor on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. *Int J Cardiol* 2007; 114: 414

96. Ji GR, Yao M, Sun CY, Li ZH, Han Z. Bsm1, Taq1, Apal and Fok1 polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in caucasian: a meta-analysis. *Bone* 2010; 47: 681-686
97. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphism and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 419-428
98. Li Y, Xi B, Wang C. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in chinese women. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 5709-5717
99. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: A participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006; 145: 255-264
100. Pedrera-Canal M, Moran JM, Vera V et al. Lack of influence of vitamin D receptor Bsm1 (rs1544410) polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal spanish women affected by osteoporosis and followed for five years. *Plos One* 2015; 10: eo138606
101. Saccone D, Asani F, Bornman L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene* 2015; 561: 171-180
102. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Gen* 2010; 19: 2739-2745
103. Wang TJ, Zhang F, Kestenbaum B et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180-188

104. Mateos Aparicio I, Redondo Cuenca A, Villanueva-Suarez MJ, Zapata Revilla MA. Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp* 2008; 23: 305-312
105. Messina MJ. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 439-450
106. Craig WJ. Phytochemicals: Guardians of our health. *J Am Diet Assoc* 1997; 97: 199-204
107. Rowland I, Faughnam M, Hoey L, Wahale K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* 2003; 89: 45-58
108. Perez Castrillón JL, De Luis D, Dueñas Laita A. Atherosclerosis and osteoporosis. *Minerv Med* 2008; 99: 45-54
109. McCormick RK. Osteoporosis: Integrating, biomarkers and other diagnostic correlatos into the management of bone fragility. *Altern Med Rev* 2007; 12: 113-145
110. Atmaca A, Kleerekoper M, Bayraktar M. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. *Menopause* 2008; 15: 1-10
111. Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 471-475
112. Chen XW, Garner SC, Anderson JBB. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 417-422

- 113.Crisafulli A, Altaville D, Squadrito G et al. Effects of the phytoestrogen genistein on the circulating soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand-osteoprotegerin system in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 188-192
- 114.Migliaccio S, Anderson JJB. Isoflavones and skeletal health: are these molecules redly for clinical application? *Osteoporos Int* 2003; 14: 361-368
- 115.Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2690-2694
- 116.Ruiz Larrea M, Mohan A, Paganga G, Miller N, Bolwell G, Rice-Evans C. Antioxidant activity of the phytoestrogens isoflavones. *Free Radic Res* 1997; 26: 63-70
- 117.Campbell DR, Kurzer MS. Flavanoid inhibition of aromatase enzymes activity in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 381-388
- 118.Messina H, Ho S, Alekel L. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 649-658
- 119.Ho SC, Chang SG, Yi Q, Wong E, Leung PC. Soy intake and the maintenance of peak of bone mass in Hong Kong Chinese Women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1363-1369
- 120.Ho SC, Chang SG, Yip YB, Chan CJY, Woo JLF, Sham A. Change in bone mineral density and its determinants in pre and perimenopausal women osteoporosis study. *Osteoporos Int* 2008; 19: 1785-1796

121. Ma DF, Qin LQ, Wang PY, Kato R. Soy isoflavones intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 2008; 27: 57-64
122. Liu J, Ho SC, Su Y, Chen W, Zang C, Chen Y. Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone* 2009; 44: 948-953
123. Alexandersen P, Toussaint A, Christiansen C et al. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *JAMA* 2001; 285: 1482-1488
124. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo controlled study. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1904-1912
125. Marini H, Minutoli L, Polito F et al. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women. *Ann Intern Med* 2007; 146: 839-847
126. Brink E, Coxam V, Robins S, Cassidy A, Branca F. Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind placebo controlled study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 761-770
127. Zhang X, Shu XO, Li H et al. Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1890-1895

- 128.Ma DF, Qin LQ, Wong PY, Kato R. Soy isoflavone intake inhibits bone resorption and stimulates bone formation in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 155-161
- 129.Taku K, Melby MK, Kurzer MS, Mizumo S, Watanabe S, Ishimi S. Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone* 2010; 47: 413-423
- 130.Ma DF, Qin LQ, Wang PY, Kato R. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 2008; 27: 57-64
- 131.Taku K, Melby MK, Takebayashi et al. Effect of soy isoflavones extract supplements on bone mineral density in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010; 19: 33-42
- 132.Ricci E, Cipriani S, Chiaffarino F, Malvezzi M, Parazzini F. Soy isoflavones and bone mineral density in perimenopausal and postmenopausal non-asian: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Menopause* 2010; 17: 1080-1086
- 133.Wei P, Liu M, Chen Y, Chen OC. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. *Asia Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012; 243-248
- 134.Gilad CA, Tirosh O, Schwartz B. Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. *J Endocrinol* 2006; 191: 387-398
- 135.Park CY, Weaver CM. Vitamin D interactions with soy isoflavones on bone after menopause: a review. *Nutrients* 2012; 4: 1610-1621

136. Swami S, Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. Genistein potentiates the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D (3) in DU145 human prostate cancer cells: role of the direct inhibition of CYP24 enzyme activity. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 241: 49-63
137. Farhan H, Wahala K, Cross HS. Genistein inhibits vitamin D hydroxylases CYP24 and CYP27B1 expression in prostate cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84: 423-429
138. Swami S, Krishnan AV, Moreno J, Bhattacharyya RB, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol and genistein actions to inhibit the prostaglandin pathway: potential combination therapy to treat prostate cancer. *J Nutr* 2007; S205-S220
139. Blackwell KA, Raiz LG, Pilbeam CC. Prostaglandin in bone: bad cop, good cop ? *Trend Endocrinol Metab* 2010; 21: 294-301
140. Turbi C, Herreo-Beaumont G, Acebes JC et al. Compliance and satisfaction with raloxifene versus alendronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis in clinical practice: an open-label, prospective non randomized, observational study. *Clin Ther* 2004; 26: 245-256
141. Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type 1 collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 2008; 54: 188-196
142. Schmidt-Gay KH, Spanuth E, Kotting J et al. Performance evaluation of automated assays for β -crosslaps, N-MID-Osteocalcin and intact parathyroid hormone (BIOROSE Multicenter Study). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 90-95
143. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-989

144. Bouillon R. Vitamin D from photosynthesis metabolism and action to clinical application. In DeGroot LI, Jameson JL editors. Endocrinology. Philadelphia Saunders WB 2001; 1009-1028
145. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical applications. In Favus M editor. Primer of the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Washington DC. American Society for Bone and Mineral Research 2006; 129-137
146. Carnevale V, Modoni S, Pileri M et al. Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from Southern Italy seasonal and gender differences. Osteoporos Int 2001; 12: 1206-1230
147. Meier C, Woitge HW, Witte K, Lemmer B, Seibel MJ. Supplementation with oral vitamin D₃ and calcium during winter prevents seasonal bone loss: a randomized controlled open-label prospective trial. J Bone Miner Res 2004; 19: 1221-1230
148. Viljakainen HT, Polssa A, Karkkainen M et al. A seasonal variation of calciotropic hormones, bone turnover and bone mineral density in early and mid puberty girls- a cross sectional study. Br J Nutr 2006; 96: 124-130
149. Hagenau T, Vest R, Gissel TN et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. Osteoporos Int 2009; 20: 133-140
150. Lips P, Duong T, Oleksik A et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1212-1221

151. Van der Wielen RP, Lowik MR, van der Berg H et al. Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *Lancet* 1995; 346: 207-210
152. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7: 439-440
153. Rabenbergh N, Hintzpeter B, Mensink GBM. Vitamin D status among adults in Germany- results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health* 2015; 15: 641
154. Kull M, Kallikorm R, Tamm A, Lember M. Seasonal variance of 25-(OH) vitamin D in the general population of Estonia, a Northern European country. *BMC Public Health* 2009; 9: 22
155. Bhattoa HP, Bettembuk P, Ganacharya S, Balogh A. Prevalence and seasonal variation of a hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal hungarian women. *Osteoporos Int* 2004; 15: 447-451
156. Brouwer-Brolsma EM, Vaes AMM, Van der Zwaluw NL et al. Relative importance of summer sun exposure, vitamin D intake and genes to vitamin D status in Dutch older adults: The B-PROOF study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; doi 10.1016/j.jsbmb.2015.08.008
157. Burnand B, Sloutskis D, Gianoli F et al. Serum 25-hydroxyvitamin D: distribution and determination in the Swiss population. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 537-542
158. Rockell JE, Skeaff CM, Williams SM, Green TJ. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of New Zealanders aged 15 years and older. *Osteoporos Int* 2006; 17: 1382-1389

159. Ono Y, Suzuki A, Kotake M et al. Seasonal changes of serum 25-hydroxy vitamin D and intact parathyroid hormone levels in a normal Japanese population. *J Bone Miner Metab* 2005; 23: 147-151
160. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulation from NHANES III. *Bone* 2002; 30: 771-777
161. Levis S, Gomez A, Jimenez C et al. Vitamin D deficiency and seasonal variation in an adult South Florida population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1557-1562
162. Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Perez-Sacristan B. Seasonal variation of serum α and β -cryptoxanthin and 25-OH-vitamin D₃ in women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2008; 19: 717-720
163. Olmos JM, Hernandez JL, García Velasco P, Martínez J, Llorca J, Gonzalez Macias J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporos Int* 2016; 27: 105-113
164. Gallagher JC, Sai A, Templin T, Smith L. Dose response to vitamin D supplementation in postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2012; 156: 425-437
165. Aloia J, Bojadziesvski Y, Yusupov E et al. The relative influence of calcium intake and vitamin D status on serum parathyroid hormone and bone turnover biomarkers in a double-blind placebo-controlled parallel group, longitudinal factorial design. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3216-3224
166. Aloia J, Dhaliwal R, Shieh A, Mikhail M, Islam S, Yeh JK. Calcium and vitamin D supplementation in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E1702-E1709

167. Trautvetter U, Neef N, Leiterer M, Kiehntopf M, Kratzsch J, Jahreis G. Effect of calcium phosphate and vitamin D3 supplementation on bone remodelling and metabolism of calcium, phosphorus, magnesium and iron. *Nutr J* 2014; 13:6
168. Barnes MS, Robson PJ, Bonham MP, Strain JJ, Wallace JM. Effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and bone turnover markers in young adults *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 727-733
169. Seamans KM, Hill TR, Wallace JMW et al. Cholecalciferol supplementation throughout winter does not affect markers of bone turnover in healthy young and elderly adults. *J Nutr* 2010; 454-460
170. Kruger MC, Sihollum LM, Kuhn-Sherlock B et al. The effect of a fortified milk drink on vitamin D status and bone turnover in postmenopausal women from South East Asia. *Bone* 2010; 46: 759-767
171. Palacios S, Castelo-Branco C, Cifuentes I et al. Changes in bone turnover markers after calcium enriched milk supplementation in healthy postmenopausal women: a randomized double-blind prospective clinical trial. *Menopause* 2005; 12: 63-68
172. Hunter D, Major P, Arden N et al. A randomized controlled trial of vitamin D supplementation on preventing postmenopausal bone loss and modifying bone metabolism using identical twin pairs. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2276-2283
173. Ohta H, Komukai S, Makita K, Masuzawa T, Nazawa S. Effects of 1-year ipriflavone treatment on lumbar bone mineral density and bone metabolic markers in postmenopausal women with low bone mass. *Horm Res* 1999; 51: 178-183

174. Gennari C, Adami S, Agnusdei D et al. Effect of chronic treatment with ipriflavone in postmenopausal with low bone mass. *Calcif Tissue Int* 1997; 61 (Suppl 1): S19-S22
175. Dalais FS, Ebeling PR, Kotsopoulos D, McGrath BP, Teede HJ. The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 706-709
176. Chiechi ML, Secreto G, D'Amore et al. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Memphis randomized trial. *Maturitas* 2002; 42: 295-300
177. Atteritano M, Marini H, Minutoli L et al. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic postmenopausal women: A two year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3068-3075
178. Marini H, Bitto A, Altaville D et al. Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: A follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4787-4796
179. Brink E, Coxam V, Robins S, Wahala K, Cassidy A, Brance F. Long-term consumption of isoflavone-enriched food does not affect bone mineral density, bone metabolism or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 761-770
180. Wong WW, Lewis RD, Steinberg FM et al. Soy isoflavone supplementation and bone mineral density in menopausal women: a 2-y multicenter clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1433-1439

181. Alekel DL, Van Loan MD, Koetler KJ et al. The soy isoflavones for reducing bone loss (SIRBL) Study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 218-230
182. Lappe J, Kunz I, Dendik I et al. Effect of a combination of genistein, polyunsaturated fatty acids and vitamins D3 and K1 on bone mineral density in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot study. *Eur J Nutr* 2013; 52: 203-215
183. Thorup AC, Lambert MN, Kahr HS, Bjarre M, Jeppesen PB. Intake of novel red clover supplementation for 12 weeks improves bone status in healthy menopausal women. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2015; ID: 689138
184. García-Martín A, Quesada-Charneco M, Alvarez-Guisado A, Jimenez-Moleon JJ, Fonolla Joya J, Muñoz-Torres M, Efecto de un preparado lacteo con isoflavonas de la soja sobre la calidad de vida y el metabolismo óseo en mujeres postmenopáusicas: estudio aleatorizado. *Med Clin (Barc)* 2012; 138: 47-51
185. Khalil DA, Lucas EA, Juma S, Smith BJ, Payton ME, Arjmandi BH. Soy proteína supplementation increases serum insulin-like growth factor-I in young and old men but does not affect markers of bone metabolism. *J Nutr* 2002; 132: 2605-2608
186. Rojo-Venegas K, Aguilera M, Cañadas Garre M et al. Polimorfismos del gen VDR en el riesgo de fracturas osteoporóticas en una población adulta española. *Ars Pharmaceutica* 2010; 51 (Supl 3): 193-201

187. Moran JM, Pedrera Canal M, Rodriguez –Velasco FJ et al. Lack of association of vitamina D receptor Apal and Bsml gene polymorphisms with bone mineral density in spanish postmenopausal population. *Int J Mol Sci* 2015; 16
188. Fontova Garrofe R, Gutierrez Fornes C, Broch Montene M et al. Polimorfismo del gen del receptor de la vitamina D, masa ósea y recambio óseo en mujeres con osteoporosis postmenopáusica. *Rev Clin Esp* 2000; 200: 198-202
189. Panizo- García S, Parisi-Capdevila E, Valdivieso-Revilla JM, Roselló-Aubach LC, Fernandez-Giraldez E. Polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D en personas con síndrome de Down. *Rev Med Int Síndrome Down* 2006; 10: 2-7
190. Bustamante M, Nogues X, Enjuanes A et al. COLIA 1, ESR1, VDR and TGF β 1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007; 18: 235-243
191. Bandres E, Pombo I, Gonzalez-Huarriz M, Rebollo A, Lopez G, García- Foncillas J. Association between bone mineral density and polymorphism of the VDR, ER α , COLIA1 and CTR genes in spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 312-321
192. Barry EL, Rees JR, Peacock JL et al. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1 and VDR modify the efficacy of vitamin D3 supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E2133-E2137
193. Elnenaie MO, Chandra R, Mangion T, Moniz C. Genomic and metabolomic patterns segregate with responses to calcium and vitamin D supplementation. *Br J Nutr* 2011; 105: 71-79

194. Nieves SH, Ralston E, Vazquez B et al. Vitamin D receptor FokI polymorphism influences response to vitamin D supplementation in postmenopausal African-American women. *Int J Endocrinol* 2007; 12: 126-132
195. Abrams SA, Griffin IS, Hawthorne KM et al. Vitamin D receptor FokI polymorphisms affect calcium absorption, kinetics and bone mineralization rates during puberty. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 945-950
196. Gennari L, Becherini L, Masi L. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 460-463
197. Serrano JCE, De Lorenzo D, Cassanye A et al. Vitamin D receptor BsmI polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr* 2013; 8: 561-569
198. Zambrano-Morales M, Borjas L, Fernandez E et al. Asociación del haplotipo BBAATT del gen del receptor de la vitamina D con la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. *Invest Clin* 2008; 49: 29-38
199. Grundberg E, Lau EMC, Pastinen T et al. Vitamin D receptor 3' haplotypes are unequally expressed in primary human bone cells and associated with increased fractures risk: The MrOs study in Sweden and Hong Kong. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 832-840
200. Kim SW, Lee JM, Ha JH et al. Association between vitamin D receptor polymorphisms and osteoporosis in patients with COPD. *Int J COPD* 2015; 10: 1809-1817

201. Gonzalez-Mercado A, Sanchez-López JY, Regla-Nava JA et al. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Genet Mol Res* 2013; 12: 2755-2763
202. Santos BR, Mascarenhas LPG, Satler F, Boguszewski MCS, Spritzer PM . Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatrics* 2012; 12: 62

ANEXOS

ANEXO 1

PRIMERA VISITA

GRUPO DE ESTUDIO: A B C

Código Interno: ___/____

DATOS DE FILIACION

Iniciales _____ Edad: _____

Fecha de nacimiento: ___/___/____ Fecha protocolo: ___/___/____ Número de HC: _____

Estado civil*: 1S 2C 3D 4V 5R Teléfonos: _____

Dirección: _____ Ciudad: _____

___ CP: _____

Área: 1: Rural < 10000 hab 2: Semiurbana 10000-25000 hab 3: Urbana > 25000 hab

FACTORES DE RIESGO PARA LA OSTEOPOROSIS.

Edad Menarquia: ___ años. Edad menopausia: ___ años.

Causa de la menopausia: 1. Natural 2. Quirúrgica

Amenorreas secundarias: 1 si 2 no

Paridad: (nº nacidos vivos) _____ Lactó: 1 si 2 no Meses lactancia acumulados: _____

Lateralidad: 1 Diestra 2 Zurda 3 Ambidiestra

Tabaco: 1 si 2 no 3 exfumador Cantidad cigarrillos/ día _____

Alcohol: 1 si 2 no 3 exbebedor Cantidad gr/día _____

Café: 1 si 2 no Cantidad tazas/día _____

Actividad física habitual: 1 sedentaria 2 activo relat. o moderado 3 activo intenso (>3h/semana)

Ingesta habitual de Calcio: <250 mg/día (una ración de lácteos)

Antecedentes de fracturas por fragilidad en familiares de primer grado: 1 si 2 no

Madre fractura de cadera: 1 si 2 no

FÁRMACOS:

Tiazidas: 1 Ahora 2 Lo tomó alguna vez 3 Nunca

Estatinas: 1 Ahora 2 Lo tomó alguna vez 3 Nunca

Beta bloqueantes: 1 Ahora 2 Lo tomó alguna vez (>6 meses) 3 Nunca

Esteroides inhalados: 1 Ahora 2 Lo tomó alguna vez 3 Nunca

Tratamiento hormonal sustitutivo: 1 Lo tomó alguna vez 2 Nunca

Tomó anticonceptivos: 1 si 2 no Si tomó: meses acumulados _____

CLÍNICA: (en la primera visita)

**Dolor: 1 si 2 asintomática // Si dolor: 1 difuso 2 toda la columna 3 C. dorsal
4 C. lumbar**

Se ha caído en el último año: 1 si 2 no

¿Puede levantarse sola sin ayuda desde una silla? 1 si 2 no

EXPLORACIÓN FÍSICA:

Talla: _____ (cm) Peso: _____ (Kg)

Marcadores remodelado óseo:

CTX:

PINP:

25-Vitamina D:

PTHi:

Fosfatasa Alcalina:

Colesterol

Triglicéridos

Col-LDL

Col-HDL

Comentarios:

ANEXO 2

**HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO
“EFECTO DE SOJA Y VITAMINA D SOBRE MARCADORES DEL REMODELADO
ÓSEO EN MUJERES CON MENOPAUSIA INFERIOR A 10 AÑOS”**

Apreciada participante:

Le agradecemos su colaboración en el estudio **“EFECTO DE SOJA Y VITAMINA D
SOBRE MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO EN MUJERES CON
MENOPAUSIA INFERIOR A 10 AÑOS”**

Este estudio puede ayudar a conocer si la administración de un preparado de soja con vitamina D disminuye el remodelado óseo y evita el deterioro del esqueleto que aparece en la menopausia.

Actualmente, la investigación médica sobre las enfermedades óseas avanza rápidamente y, por ello, es importante que usted nos dé su consentimiento para participar en el estudio. Usted podrá retirarse del mismo sin dar explicaciones, cuando quiera sin que ello repercuta en su asistencia. Además le garantizamos que sus datos serán tratados con absoluta confidencialidad de acuerdo con la Ley Orgánica de Confidencialidad de datos personales (Ley orgánica 15/1999). Usted tiene derecho a solicitarnos en cualquier momento que eliminemos de los registros sus datos personales y a recibir los resultados de las exploraciones que le hagan.

Antes de firmar este documento de autorización y en cualquier momento usted puede pedir cualquier aclaración a los médicos responsables del estudio.

La Sra..... ha sido informada de las finalidades del presente estudio, ha podido hacer las preguntas que ha considerado oportunas y acepta participar voluntariamente en él. Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin dar explicaciones y ello no repercutirá en mi tratamiento.

En prueba de conformidad firma la presente:

Firma participante

ANEXO 3

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA PACIENTE

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación. Este documento le ayudará a decidir si desea participar en el mismo

De acuerdo con la Ley española sobre ensayos clínicos, el promotor ha firmado un contrato con la Dirección del hospital, en el que se recogen los pagos a realizar por el promotor para cubrir los gastos causados por el ensayo clínico. Estos pagos podrán incluir cantidades para el médico del estudio y el resto del equipo investigador, como compensación por el trabajo extra generado por la realización del estudio

Acerca del estudio

La finalidad del estudio es :

- Comprobar si la asociación de genisteína junto con calcio y vitamina D reduce los marcadores de remodelado óseo que es un indicador del posible deterioro del hueso a largo

En este estudio se evaluarán productos cuya venta está aprobada y se trata de valorar si la asociación es más eficaz que los fármacos por separado. En el estudio participarán 150 mujeres durante un periodo de 12 semanas

¿ Qué se me pedirá que haga?

Si toma parte en el estudio , tendrá que hacer lo siguientes:

- Acudir a la consulta del médico 4 veces
- En dos de las visitas 1 y 3 acudirá en ayunas
- Tomar el fármaco según se indique

- Debe devolver el fármaco del estudio que no haya utilizado en cada visita

Se le asignará al azar a tomar genisteína-calcio-vitamina D, calcio-vitamina D o un placebo (un comprimido idéntico sin componentes activos). Ni usted ni el médico del estudio sabrá que medicamentos está tomando.

¿ Qué sucederá en las visitas del estudio ?

Cuando acude a las vistas del estudio , el médico o el personal del estudio podrán realizar algunos de los procedimientos o todos ellos

- Revisar historia clínica
- Realizar exploración física
- Obtener muestra de sangre
- Realizar test de calidad de vida y cuestionario de Morisky-Green
- Entregarle el fármaco del estudio

¿ Qué efectos pueden tener las pruebas para mi ?

Es posible que tenga molestias durante algunas de las pruebas y puede entrañar algún riesgo ya que la extracción de sangre pueda causar dolor, hematomas, mareo y rara vez infección

Efectos adversos de los fármacos

Como hemos comentado previamente los productos empleados están comercializados y aprobados por las autoridades sanitarias. En los ensayos clínicos realizados con genisteína no se han observado diferencias con el grupo placebo . No se ha descrito incremento del riesgo de cancer de mama y en algunos casos se ha observado una hiperplasia de la mucosa endometrial. En el estudio planteado, al tener una duración de 12 semanas, no se produce este hecho. La administración de

dosis elevadas de vitamina D puede provocar un incremento de las concentraciones de calcio en sangre y mayor riesgo de cálculos renales. Las dosis empleadas en nuestro estudio son mucho menores y se corresponden a las indicadas en las guías clínicas. Los suplementos de calcio pueden producir efectos secundarios digestivos como náuseas, vómitos, diarrea, gases y estreñimiento.

Otras informaciones

Si sufro algún daño derivado de la participación en el estudio ¿ Quién correrá con los gastos de médicos y hospitales ? Conforme a la legislación vigente en España sobre ensayos clínicos, el promotor del ensayo ha concertado un seguro que cubre los daños que como consecuencia del mismo pudiera resultar para la persona que lo realiza

¿ Qué ventaja puedo obtener por participar en el estudio ?

Si la combinación es eficaz puede obtener algún efecto beneficioso. Si la combinación no es eficaz o si usted recibe placebo, no obtendrá ningún efecto beneficioso. La información obtenida podrá ayudar a otras personas en el futuro

¿ Como se protegerá mi intimidad ?

Si decide participar en el estudio el médico y su equipo de investigación utilizarán los datos sanitarios que se refieren a usted para llevarlo a cabo. En este estudio, el equipo de investigación compartirá los datos sobre su salud con los organismos gubernamentales y los comités éticos que supervisan la investigación. También serán compartidos por el Promotor y quienes trabajen para él. Estos datos serán identificados por códigos anónimos

El Promotor y quienes trabajan para él podrán utilizar los datos sanitarios que reciban para:

- Comprobar si el fármaco del estudio funciona y es seguro

- Presentar la información a agencias gubernamentales de otros países.

En la práctica la transmisión de la información se hará de forma dissociada de modo que no permita identificarle y en cumplimiento de la Ley orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre de protección de datos de carácter personal y normativa complementaria. El consentimiento para el tratamiento de sus datos personales y para su cesión es revocable

¿ Recibiré alguna compensación económica ?

No se le pagará por participar en este estudio

¿ A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre ...?

- El estudio : Dr José Luis Pérez Castrillón al 983420400
- Algún daño relacionado con el estudio: Dr José Luis Pérez Castrillón al 983420400
- Mis derechos como participante en el estudio: Dr José Luis Pérez Castrillón al 983420400

Con mi firma al final, declaro que :

- He leído este formulario de consentimiento
- He tenido ocasión de hacer preguntas y ser respondidas
- Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria
- Autorizo el uso y transmisión de mis datos sanitarios según se describe en este documento
- Puedo decidir no participar en el estudio o abandonarlo en cualquier momento diciéndoselo al médico del estudio

ANEXO 4

Cuestionario Morisky-Green de cumplimiento declarado (modificado)

Paciente (Iniciales): _____
_____/_____

Nº Código:

Fecha: ____/____/2 ____

(Marcar una 'X' en la casilla que corresponda según la respuesta del paciente)

Durante su tratamiento con bifosfonatos para la osteoporosis:

a)- ¿Ha olvidado tomar la medicación alguna vez? Sí (1) No (0)

↓
-En general usted diría que se tomó la medicación
(marque lo que corresponda)

-Más del 75% de las veces

-Entre el 50- 75% de las veces

-Entre el 25-50% de las veces

-Menos del 25% de las veces

b)- ¿Ha tomado la medicación como su médico le indicó? Sí (0) No (1)

c)- Cuando se ha sentido mejor ¿ha dejado de tomar alguna vez la medicación? (1) (0)

d)- Cuando, se ha sentido mal al tomar la medicación, ¿ha dejado de tomarla? (1) (0)

Score:

- 0 Alta adherencia
- 1-2 Moderada adherencia
- 3-4 Baja adherencia

Investigador: _____

Firma:

ANEXO 5



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. FLORENTINO PINACHO PELAEZ, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Centro Hospitalario: Hospital Universitario del Río Hortega de Valladolid,

CERTIFICA:

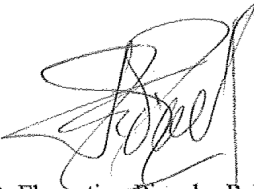
Que este Comité ha evaluado, en su reunión del día 26 de Abril de 2012, la propuesta del Promotor FARMALIDER, S.A., para que se realice el Estudio de Intervención en humanos con alimentos. Código de Protocolo: 2012/0012, titulado: **“Eficacia de un complemento alimenticio con Calcio, Vitamina D e Isoflavonas de Soja sobre marcadores del remodelado óseo de mujeres postmenopáusicas”**. Que será realizado por el **Dr. José Luis Pérez Castrillón**, como Investigador Principal y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comité acepta que dicho Estudio sea realizado en el Hospital del Río Hortega de Valladolid, por el **Dr. José Luis Pérez Castrillón** como Investigador Principal

Lo que firmo en Valladolid, a 26 de Abril de 2012


Fdo. D. Florentino Pinacho Peláez
Secretario CEIC

