

Efecto de una dieta rica en calcio sobre el metabolismo mineral y óseo en ratas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2022000100006>

Díaz-Tocados JM^{1,2,3}, Rodríguez-Ortiz ME^{1,2,3}, Almadén Y^{2,4,5,6}, Carvalho C^{7,8,9}, Frazão JM^{8,9,10}, Rodríguez M^{1,2,3,11}, Muñoz-Castañeda JR^{1,2,3,11}

1 Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Unidad de Metabolismo del Calcio y Calcificación Vascular. Córdoba (España)

2 Universidad de Córdoba. Córdoba (España)

3 Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba (España)

4 IMIBIC. Unidad de Lípidos y Aterosclerosis. Córdoba (España)

5 Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba (España)

6 Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). ISCIII. Madrid (España)

7 Hospital de Braga. Departamento de Nefrología. Braga (Portugal)

8 Instituto de Investigación e Innovación en Salud (I3S). Universidad de Oporto. Oporto (Portugal)

9 Instituto Nacional de Ingeniería Biomédica (INEB). Universidad de Oporto. Oporto (Portugal)

10 Departamento de Nefrología. Hospital São João. Oporto (Portugal)

11 Red de Investigación Renal (REDinREN). ISCIII. Madrid (España)

Fecha de recepción: 08/10/2021 - Fecha de aceptación: 14/12/2021

Trabajo remitido como prestación por una beca FEIOMM para asistir al 40º Congreso de la ASBMR (Montréal, 2018)

Resumen

Objetivo: Una dieta rica en calcio se ha recomendado generalmente para mantener una adecuada salud ósea; no obstante, estudios recientes han despertado la controversia sobre sus beneficios. En este sentido, la mayoría de los estudios existentes en modelos animales están realizados con dietas deficientes en vitamina D. En este estudio se evaluará el efecto de una dieta rica en calcio sobre el metabolismo mineral y la histomorfometría ósea en rata. Además, en células UMR-106 se evaluó el efecto directo del suplemento de calcio sobre la expresión de genes osteogénicos.

Material y métodos: Un grupo de ratas wistar macho de aproximadamente 3 meses de edad fue alimentado con dieta de contenido normal de calcio (0,6%) mientras que otro grupo se alimentó con dieta de alto contenido en calcio (1,2%). Transcurridos 20 días se recogieron muestras de orina 24h, sangre para análisis bioquímicos y el fémur para estudio de histomorfometría ósea. *In vitro*, se estudió la expresión génica de *Runx2*, *Osterix* y *Osteocalcina* en células UMR-106 cultivadas en condiciones de alto contenido en calcio.

Resultados: La ingesta de una dieta rica en calcio redujo la concentración de PTH y calcitriol en plasma, aumentó la calciuria y disminuyó la fosfatúria. A nivel óseo, se observó una drástica disminución de la actividad osteoblástica consistente con la bajada de PTH; sin embargo, el volumen trabecular permaneció similar en ambos grupos. *In vitro*, el suplemento de calcio no disminuyó la expresión de marcadores osteoblásticos en UMR-106, indicando que los efectos *in vivo* son mayormente indirectos y debidos a la bajada de PTH.

Conclusiones: Una dieta de alto contenido en calcio reduce la concentración de PTH y calcitriol en plasma, resultando en una disminución de la actividad osteoblástica.

Palabras clave: Calcio, PTH, calcitriol, histomorfometría ósea.

INTRODUCCIÓN

El principal reservorio de calcio del organismo es el hueso, donde se almacena alrededor del 99% del calcio total en forma de hidroxapatita. Así, el contenido de calcio presente en los fluidos extracelulares sólo representa una pequeña fracción del calcio total.

En individuos sanos, la concentración de calcio en sangre varía entre 8,6 y 10,4 mg/dl, estando alrededor del 40% unido a proteínas y el 6% a sales de fosfato, citrato o bicarbonato. La actividad metabólica del calcio se atribuye al calcio iónico, que representa el 54% del

calcio total en sangre, y está regulado de forma muy precisa de manera que los valores plasmáticos se mantienen en un rango de entre 4,4 y 5,4 mg/dl (1,1-1,35 mM)¹.

Con respecto a la salud ósea, los beneficios de una dieta rica en calcio sobre la homeostasis del hueso están siendo discutidos². Así, por ejemplo, el suplemento de calcio ha sido comúnmente recomendado para el mantenimiento de la salud ósea y la prevención de la osteoporosis; sin embargo, estudios de metaanálisis han mostrado que no siempre este suplemento de calcio tiene un efecto positivo. En una población general de



Correspondencia: Juan Miguel Díaz Tocados (b22ditoj@uco.es)

adultos, se ha observado que ni el suplemento con vitamina D, calcio ni la combinación de ambos se asocian con una disminución del riesgo de fractura³, aumentando con ello la controversia acerca de la efectividad de estos suplementos. En el mismo sentido, en un estudio longitudinal prospectivo realizado en Suecia en el que se estudió la incidencia de fracturas y osteoporosis en mujeres adultas durante 19 años a las que se estimó la ingesta de calcio mediante cuestionario concluyó que una mayor ingesta del mismo no se asociada con una reducción del riesgo de fractura u osteoporosis⁴.

En modelos animales, la mayoría de los estudios sobre los efectos óseos asociados al calcio están desarrollados en modelos en los que se reducen los niveles de vitamina D, bien a través de dietas deficientes en vitamina D o bien en animales *knockout* para el receptor de vitamina D (VDR). En ratas wistar macho alimentadas con una dieta deficiente en vitamina D desde estadios prenatales, se ha demostrado que una dieta deficiente en vitamina D disminuye la densidad mineral ósea, la longitud del fémur y provoca alteraciones histológicas como acumulación de osteoide, aumento de actividad osteoblástica o disminución de actividad osteoclástica. Cuando estas ratas con una dieta deficiente en vitamina D fueron alimentadas con un suplemento de calcio en la dieta, se recuperó parcialmente la densidad mineral ósea, y la longitud de la tibia, disminuyó el volumen de osteoide y la actividad osteoblástica, mientras que aumentó el número de osteoclastos, lo que produjo una disminución del volumen óseo trabecular⁵. En otro estudio similar, animales alimentados con dieta deficiente en vitamina D disminuyeron el contenido de calcio en el hueso, que fue reestablecido con la infusión de calcio y fósforo indicando que los efectos de la vitamina D sobre el hueso deben ser principalmente indirectos y derivados de su función sobre la regulación del metabolismo mineral⁶.

Por otro lado, en ratones *knockout* para el receptor de vitamina D y para 25-hidroxivitamina D 1- α -hidroxilasa, los cuales son hipocalcémicos, se observó un incremento de la formación ósea, del volumen óseo y del número de osteoblastos, que se asoció con el consecuente incremento de los niveles de hormona paratiroidea (PTH) aunque los animales fueran alimentados con una dieta sin lactosa de alto contenido en calcio; sin embargo, el número de osteoclastos no se asoció a los niveles de PTH en estos animales y permaneció similar al de los ratones con fenotipo silvestre y niveles de PTH normales. Cuando los animales se alimentaron con una dieta de rescate (2% calcio, 1,25% fósforo, 20% lactosa, y 2,2 unidades/g de vitamina D) se consiguió prevenir la hipocalcemia, el hiperparatiroidismo y, consecuentemente, el número de osteoblastos, la tasa de aposición mineral y el volumen óseo fueron reducidos⁷.

En base a estas premisas, el objetivo de este estudio fue investigar el efecto de una dieta con alto contenido en calcio sobre la histomorfometría ósea en rata, así como sobre la osteogénesis de células UMR-106.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal de IMIBIC/Universidad de Córdoba de acuerdo a lo dispuesto en la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y al Consejo de Europa del 22 de septiembre de 2010, las guías ins-

titucionales para el cuidado y el uso de animales de laboratorio y la Declaración de Helsinki, autorización de protocolo número 14/03/2018/026.

Diseño experimental

Se usaron ratas wistar macho con aproximadamente 3 meses de edad para evitar interacciones relacionadas con el sexo ya que en rata existe un dimorfismo sexual en el fenotipo óseo que parece ser multifactorial⁸. Los animales fueron alimentados con dietas de contenido normal (0,6% Ca; n=6) ó alto contenido de calcio (1,2% Ca; n=9) y ambas dietas tuvieron un contenido de fósforo de 0,2%. Tras 20 días, las ratas fueron introducidas en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas. Al día siguiente los animales fueron sacrificados mediante punción de la aorta abdominal y exsanguinados bajo anestesia general con sevoflurano. La sangre fue procesada para separar el plasma y el fémur derecho se puso en etanol 70% para su posterior inclusión en metilmetacrilato.

Bioquímica en sangre y orina

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos heparinizados (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EEUU) y centrifugadas a 2000 x g, durante 10 minutos a 4°C para separar el plasma que fue guardado a -80°C hasta la realización de las determinaciones bioquímicas. Las muestras de orina de 24h se centrifugaron a 2000 x g, durante 10 minutos a 4°C para descartar el sedimento y las alícuotas se guardaron a -20°C hasta su análisis. Para la determinación del contenido de fósforo, calcio total y creatinina se usaron kits colorimétricos (BioSystems SA, Barcelona, España). La fracción de excreción de fósforo, expresada como porcentaje, fue calculada según la fórmula: (fósforo orina x creatinina plasma x 100)/(fósforo plasma x creatinina orina). La cuantificación de calcio iónico se realizó en plasma justo después del sacrificio y antes de su congelación en un analizador de iones (Spotlyte Ca²⁺/pH (Menarini Diagnostics, Barcelona, España). Se determinaron mediante ELISA los contenidos circulantes de PTH bioactiva (Immutopics, San Clemente, CA, EEUU) y FGF23 intacto (Kainos Laboratories, Tokio, Japón). La concentración de calcitriol se midió mediante radioinmunoensayo (Immunodiagnostic systems, Boldon, UK). Todos los kits se usaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Inclusión en metilmetacrilato y análisis de histomorfometría ósea

Tras el sacrificio, se extrajo el fémur derecho de cada animal y se incluyó en etanol al 70%. Posteriormente, los fémures fueron deshidratados en alcohol, aclarados con xileno, e incrustados en 75% de metacrilato de metilo, 25% de ftalato de dibutilo y peróxido de benzoilo al 2,5% p/v. El análisis de histomorfometría fue realizado en secciones de 5 μ m sin decalcificar que fueron teñidas con el método de Villanueva AR de tricrómico de Goldner modificado⁹. Brevemente, los cortes de hueso se fijaron con etanol al 50% con presión durante 24h a 37°C, luego se rehidrataron y tiñeron con hematoxilina-cloruro férrico 1:1, posteriormente se aclararon con ácido clorhídrico al 1% y se azulearon con carbonato de litio saturado. Después de lavar con agua, los cortes se tiñeron con colorante tricrómico Goldner durante 20 minutos y luego se aclararon con ácido acético 1%. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución alcohólica de azafrán 1% p/v durante 5 minutos,

se deshidrataron con etanol y se montaron. El tejido calcificado se tiñó de verde y las áreas teñidas de rojo se consideraron osteoide. Los parámetros histomorfométricos óseos se evaluaron a 200x en un microscopio óptico Leica DM4000B (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) con una cámara Olympus DP72 (Olympus, Tokyo, Japan) utilizando el Software OsteoMeasure (OsteoMetrics, Decatur, IL, EEUU). El análisis se realizó en la parte distal del hueso dentro de la esponjosa secundaria (a 1 mm separado de la placa de crecimiento y a una distancia de 0,25 mm aproximadamente desde el hueso endocortical). Los parámetros de histomorfometría ósea se calcularon según las recomendaciones de la *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR)¹⁰.

Experimentos *in vitro*

El efecto de elevadas concentraciones de calcio sobre la osteogénesis de células UMR-106 fue también evaluado. Las células se cultivaron con DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con FBS 10% (Lonza), ultraglutamina 2 mM (Lonza), piruvato sódico 1 mM (Lonza), HEPES 20 mM (Sigma-Aldrich), penicilina 100U/ml y estreptomina 100 mg/ml. Una vez que las células alcanzaron un 90% aproximadamente de confluencia el medio de cultivo fue cambiado a DMEM libre de calcio (Gibco, Grand Island, NY) suplementado como se indica anteriormente y además se utilizó una solución de cloruro cálcico 0,1 M (Sigma-Aldrich) para incrementar la concentración de calcio en el medio de cultivo hasta 1,25 mM (concentración normal en sangre) y 1,8 mM (equivalente a una hipercalemia). Después de 48h, las células fueron lisadas y procesadas para aislamiento de ARN total. Se realizaron 3 experimentos independientes con 4 réplicas por cada grupo.

Aislamiento de ARN y RT-PCR

El ARN total fue extraído con Trizol (Sigma-Aldrich) y la concentración final se cuantificó mediante espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies). Las muestras de ARN se trataron posteriormente con DNAsa (Sigma-Aldrich) y la PCR a tiempo real se realizó con 50 ng de ARN tratado con DNAsa con el kit SensiFAST SYBR No-ROX One-Step (Bioline). Los cebadores usados fueron: *Runx2* (Sentido 5'CGG-GAA-TGA-TGA-GAA-CTA-CTC3' Antisentido 5'CGG-TCA-GAG-AAC-AAA-CTA-GGT3'), *Osterix* (Sentido 5'GTA-CGG-CAA-GGC-TTC-GCA-TCT-GA3' Antisentido 5'TCA-AGT-GGT-CGC-TTC-GGG-TAA-AG3'), *Osteocalcina* (Sentido 5'TCT-GAG-TCT-GAC-AAA-GCC-TTC-ATG3' Antisentido 5'TGG-GTA-GGG-GGC-T GG-GGC-TCC3') y *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* (Sentido 5'AGG-GCT-GCC-TTC-TCT-TGT-GAC3' Antisentido 5'TGG-GTA-GAA-TCA-TAC-TGG-AAC-ATG-TAG3'). La amplificación de la RT-PCR se llevó a cabo en un Lightcycler 480 (Roche Molecular Biochemicals). La expresión de los genes diana fue normalizada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando *GAPDH* como constitutivo.

Análisis estadístico

Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las diferencias entre los dos grupos fueron estudiadas mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Los grupos fueron considerados significativamente diferentes para una $p < 0,05$. Los análisis estadísticos y la edición de las gráficas se realizaron con el programa GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU).

RESULTADOS

Bioquímica en sangre y orina

El grupo de animales alimentado con una dieta rica en calcio mostró niveles plasmáticos de calcio y fósforo similares a los del grupo alimentado con calcio normal (figura 1 a y b respectivamente). Sin embargo, la dieta con alto contenido de calcio produjo tanto una disminución de la concentración plasmática de PTH intacta (figura 1 c) como de calcitriol (figura 1 d). Los niveles de FGF23 intacto permanecieron similares en ambos grupos (figura 1 e). Como se esperaba, el análisis de orina de 24h mostró un incremento de la calciuria y una disminución de la fosfatúria en las ratas alimentadas con dieta rica en calcio (figura 1 f y g respectivamente).

Histomorfometría ósea

El volumen de hueso trabecular y el volumen de osteoide de las ratas alimentadas con dieta rica en calcio permanecieron similares respecto al de las ratas alimentadas con una dieta normal de calcio (figura 2 a y b), mientras que se observó una reducción significativa de la superficie de osteoide (figura 2 c) en el grupo de animales alimentados con dieta rica en calcio, que fue consistente con una disminución de la superficie de hueso cubierta por osteoblastos (figura 2 d). Tanto la superficie de resorción como la superficie de hueso cubierta por osteoclastos fueron similares en ambos grupos (figura 2 e y f respectivamente). A nivel de micro-arquitectura trabecular no se observaron diferencias respecto al grosor trabecular, separación trabecular y número de trabéculas (figura 2 g, h, i).

Efecto del calcio sobre la osteogénesis de UMR-106

Para estudiar *in vitro* el efecto directo del calcio sobre los osteoblastos utilizamos la línea de células osteoblásticas de rata UMR-106. El medio de cultivo de estas células fue suplementado con calcio hasta alcanzar una concentración de 1,8 mM y se comparó con células cultivadas con medios de cultivo con contenido normal de calcio (1,25 mM). Tras 48h de tratamiento, se observó que los altos niveles de calcio no modificaron la expresión de genes osteogénicos como *Runx2*, *Osterix* u *Osteocalcina* (figura 4 a, b y c respectivamente).

DISCUSIÓN

En este estudio la dieta rica en Ca durante 21 días no promovió diferencias significativas en los niveles plasmáticos de Ca ó P a costa de incrementar la calciuria y disminuir la fosfatúria. Esto tuvo una repercusión directa sobre los niveles de PTH y calcitriol en plasma. Este efecto podría ser debido a una hipercalemia transitoria al inicio del experimento resultando en una posterior disminución de la producción de PTH, hipercalciuria y de la síntesis de calcitriol, ya que parece consistente con una activación del receptor de calcio (CaSR) en las glándulas paratiroides y en el riñón, lo cual se ha descrito ampliamente que resulta en la disminución de PTH y un incremento de la excreción urinaria de calcio^{11,12}. Los niveles de calcio en plasma, que permanecieron similares en ambos grupos, también podrían deberse a esta excesiva calciuria o a una adaptación del organismo al elevado aporte de calcio en la dieta de manera prolongada. Con respecto al hueso, los animales alimentados con dieta de alto contenido en calcio mostraron una reducción de la actividad osteoblástica asociada con la disminución de PTH y una tendencia a disminuir el volumen óseo trabecular.

Es interesante destacar que en animales alimentados con dieta deficiente en vitamina D se produce osteosclerosis a nivel trabecular y la infusión de calcio y fósforo resulta en una disminución de la actividad osteoblástica¹³. Estas observaciones apoyan nuestros resultados que sugieren que un incremento de la carga de calcio reduce los osteoblastos en la superficie ósea. Además, en nuestro estudio la actividad osteoclástica no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo alimentado con dieta de contenido normal en calcio a pesar de la disminución de PTH sugiriendo que otros mecanismos deben estar implicados.

Una limitación de este estudio *in vivo* es que no se realizó un marcaje con fluorocromos específicos tipo calceína en estos animales por lo que no se pudieron determinar parámetros cinéticos de formación y mineralización.

En este estudio la ingesta de una dieta rica en calcio durante 3 semanas no produjo cambios significativos en varios parámetros de histomorfometría ósea (volumen óseo trabecular, volumen de osteoide, separación trabecular y número de trabéculas) a pesar de una disminución significativa de la actividad osteoblástica y una actividad osteoclástica similar.

In vitro, células UMR-106 que fueron tratadas con altos niveles de calcio no mostraron cambios en la expresión génica de *Runx2*, *Osterix* y *Osteocalcina*, lo que sugiere que la disminución de la actividad osteoblástica observada en el hueso no está directamente influenciada por una alta concentración de calcio, sino que podría estar más bien relacionada con la disminución de la concentración de PTH. La línea celular de osteosarcoma de rata UMR-106 es un modelo con fenotipo osteoblástico ampliamente usado en el que la respuesta a calcio extracelular y PTH ha sido bien caracterizada^{14,15}. Previamente, nuestro grupo ha publicado que la activación del CaSR por un calcimimético aumenta la

Figura 1. Bioquímica en plasma y orina. Las barras representan media ± error estándar. U de Mann-Whitney test. * p<0,05 vs 0,6% Ca. ** p<0,01 vs 0,6% Ca

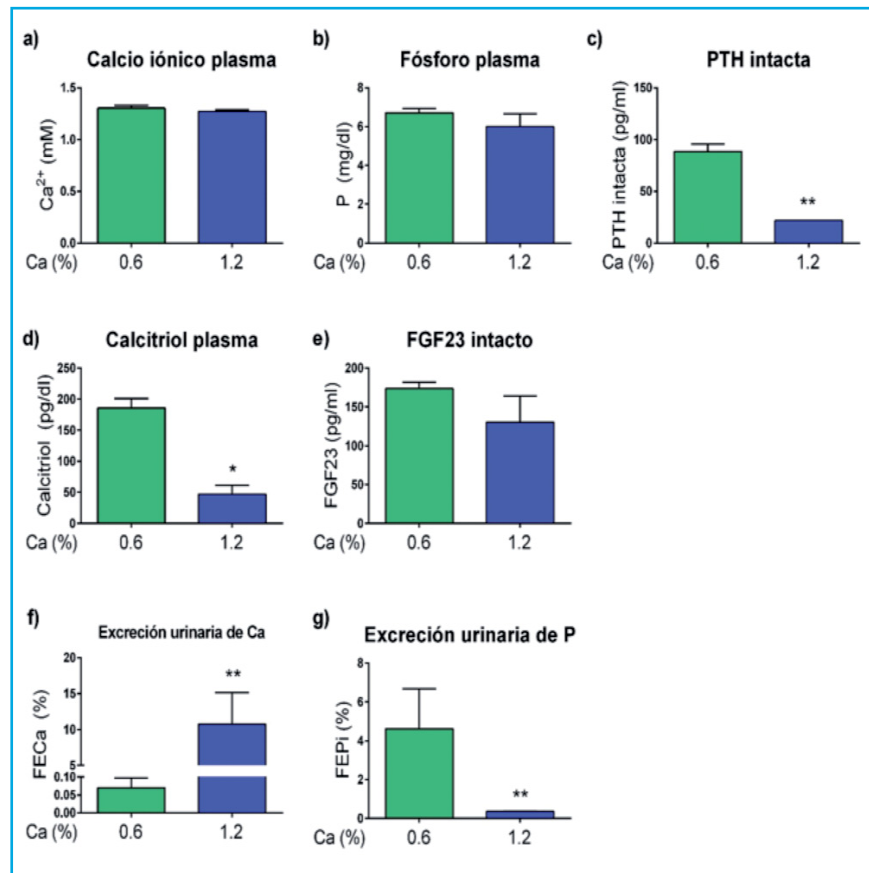


Figura 2. Análisis de histomorfometría ósea. Las barras representan media ± error estándar. U de Mann-Whitney test. * p<0,01 vs 0,6% Ca

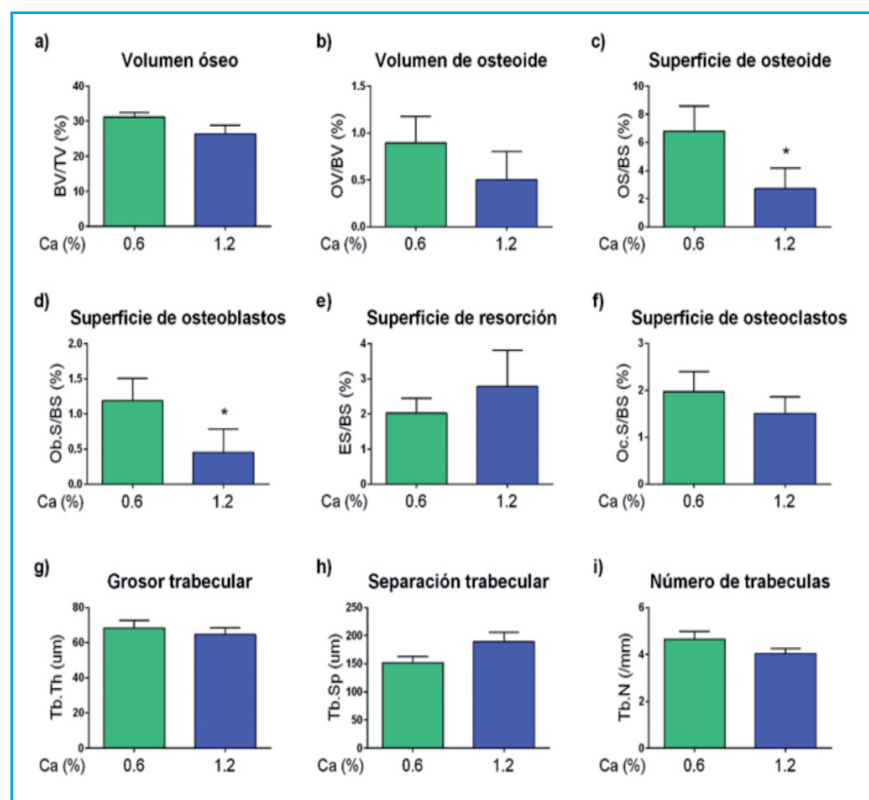
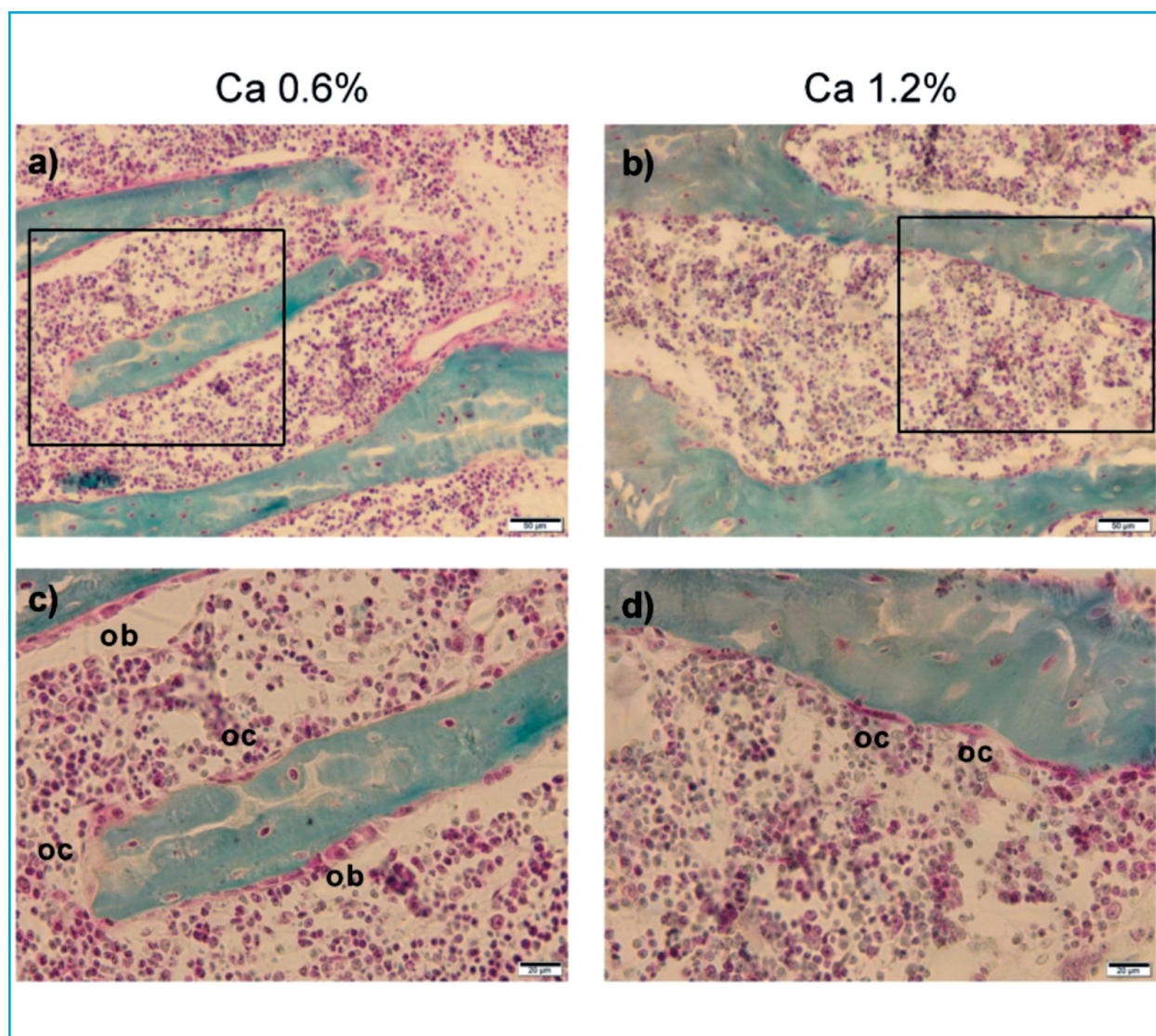


Figura 3. Microfotografías de las muestras de hueso teñidas con tricrómico de Goldner. oc: osteoclastos. ob: osteoblastos. (a y b) aumentos: 100x. Barra de escala: 50 μ m. El recuadro indica el área aumentada en las siguientes microfotografías. (c y d) aumentos: 200x. Barra de escala 20 μ m



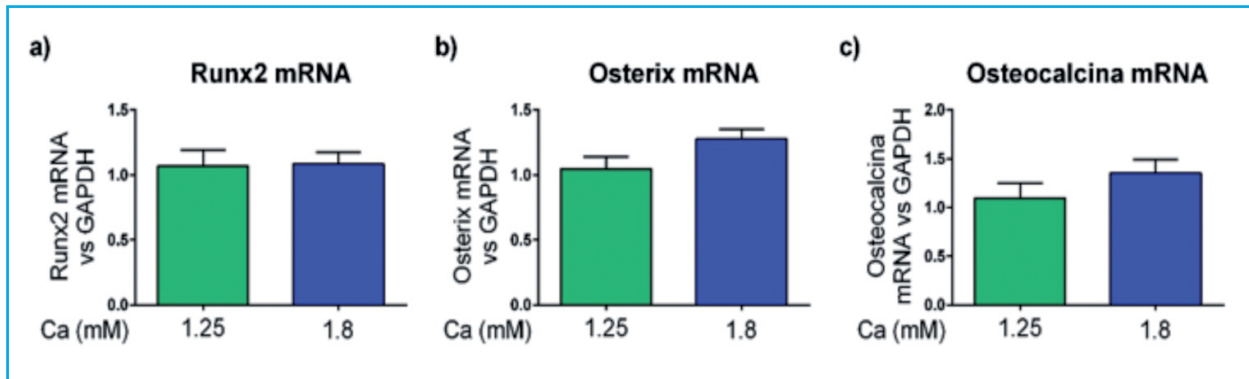
osteogénesis y el remodelado óseo, por lo que, presumiblemente, sus activadores naturales como el calcio iónico y otros deberían tener un efecto similar¹⁶. En este estudio previo se examinó el efecto del calcimimético en UMR-106 con una concentración muy baja de calcio (0,5 mM), por lo que el tratamiento con la droga producía una respuesta más significativa. Por lo tanto, en este experimento *in vitro* con UMR-106 con una concentración de calcio normal (1,25 mM), en la que el CaSR estaría en un alto grado de activación en base a lo descrito en glándulas paratiroides¹⁷, un calcio alto (1,8 mM) no debería producir una activación adicional importante y por ello no se observaría un incremento significativo de la expresión de genes osteogénicos. Probablemente 1,8 mM de calcio provoca sólo un ligero incremento en la activación del CaSR con respecto a 1,25 mM de calcio, la cual sólo produce tendencias a incrementar *Osterix* y *Osteocalcina* como se observa en este estudio.

En un estudio con voluntarios jóvenes y sanos, se evaluaron los efectos de la administración aguda de 400 mg

de calcio oral y después de 10 horas se observó que la concentración de PTH sérica disminuyó, acompañada por un descenso de los niveles séricos de telopeptidos de colágeno tipo I, sin embargo no mostraron datos relativos a la formación de hueso¹⁸. Este estudio apoya nuestras observaciones de que el suplemento de calcio en la dieta reduce los niveles de PTH, resultando en cambios a nivel óseo. En este estudio de manera aguda la disminución de PTH produjo un descenso de la actividad osteoclástica que no hemos observado en nuestro estudio con ratas y que probablemente se deba al tratamiento prolongado con dieta rica en calcio. Es importante destacar que la expresión de 25(OH)D-1 α -hidroxilasa está directamente regulada por la PTH¹⁹, y que por lo tanto un incremento de la ingesta de calcio resultaría en una disminución de la síntesis de calcitriol, lo cual sería consistente con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En conclusión, una dieta rica en calcio podría conducir a una reducción de la actividad osteoblástica debido a una disminución de la producción de PTH que además resultaría en una bajada de la vitamina D activa.

Figura 4. Expresión de genes osteogénicos en células UMR-106 tratadas con altos niveles de calcio. Se adicionó cloruro cálcico (0,1 M) hasta alcanzar niveles correspondientes a una situación de hipercalcemia (1,8 mM) y se compararon con niveles normales (1,25 mM). La exposición a los distintos niveles de calcio extracelular fue de 48h. Las barras representan media \pm error estándar



Agradecimientos: JMDT tiene un contrato Sara Borrell [CD19/00055] por el Ministerio Español de Ciencia, Innovación y Universidades, ISCIII, cofinanciado por el Fondo Social Europeo "El Fondo Social Europeo invierte en tu futuro". YA y JRMC son investigadores senior contratados por el programa

Nicolás Monárdes, Servicio Andaluz de Salud (Junta de Andalucía). También agradecemos a la Sociedad Española de Nefrología por el apoyo en la estancia realizada en Oporto y a la FEIOMM por la beca de asistencia a la ASBMR de 2018 en Montreal.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Murray J, Favus, David A, Bushinsky, and Jacob Lemann Jr. Regulation of calcium, magnesium, and phosphate metabolism. *Primer of the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th Edition. Rittenhouse Book Distributors, 2006.
2. Chiodini I, Bolland MJ. Calcium supplementation in osteoporosis: useful or harmful? *Eur J Endocrinol*. 2018; 178:D13-D25.
3. Zhao J-G, Zeng X-T, Wang J, Liu L. Association Between Calcium or Vitamin D Supplementation and Fracture Incidence in Community-Dwelling Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2017;318:2466-2482.
4. Warensjö E, Byberg L, Melhus H, Gedeberg R, Mallmin H, Wolk A, et al. Dietary calcium intake and risk of fracture and osteoporosis: prospective longitudinal cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1473.
5. Schaafsma G, Visser WJ, Dekker PR, Van Schaik M. Effect of dietary calcium supplementation with lactose on bone in vitamin D-deficient rats. *Bone*. 1987;8:357-362.
6. Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol*. 1984;246:E493-498.
7. Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem*. 2004;279:16754-16766.
8. Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinol*. 2010; 207:127-134.
9. Villanueva AR. A New Goldner's One-Step Trichrome Stain for Identification of Osteoid Seams, Bone and Cells in Undecalcified, Plastic Embedded Sections of Bone. *J Histotechnol*. 1988;11: 249-251.
10. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28:2-17.
11. Felsenfeld A, Rodríguez M, Levine B. New insights in regulation of calcium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22:371-376.
12. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10:1257-1272.
13. Weinstein RS, Underwood JL, Hutson MS, DeLuca HF. Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *Am J Physiol*. 1984;246:E499-505.
14. Mitchell J, Rouleau MF, Goltzman D. Biochemical and morphological characterization of parathyroid hormone receptor binding to the rat osteosarcoma cell line UMR-106. *Endocrinology*. 1990;126:2327-2335.
15. Yamaguchi T, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. Expression of extracellular calcium (Ca²⁺ + o)-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243:753-757.
16. Díaz-Tocados JM, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Pineda C, Martínez-Moreno JM, Herencia C, et al. Calcimimetics maintain bone turnover in uremic rats despite the concomitant decrease in parathyroid hormone concentration. *Kidney Int*. 2019;95:1064-1078.
17. Valle C, Rodríguez M, Santamaría R, Almadén Y, Rodríguez ME, Cañadillas S, et al. Cinacalcet Reduces the Set Point of the PTH-Calcium Curve. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2430-2436.
18. Sadideen H, Swaminathan R. Effect of acute oral calcium load on serum PTH and bone resorption in young healthy subjects: an overnight study. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:1661-1665.
19. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:1387-1391.