ALESSANDRA CEREZO BONFÁ

**Polimorfismos de nucleotídeo único dos genes do sistema OPG/RANKL
em mulheres pré-menopausadas com lúpus: associação com massa
óssea e fratura vertebral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo
Orientadora: Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

SÃO PAULO

2014

ALESSANDRA CEREZO BONFÁ

**Polimorfismos de nucleotídeo único dos genes do sistema OPG/RANKL
em mulheres pré-menopausadas com lúpus: associação com massa
óssea e fratura vertebral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Versão corrigida da Dissertação. Versão original se
encontra disponível na FMUSP

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bonfá, Alessandra Cerezo

Polimorfismos de nucleotídeo único dos genes do sistema OPG/RANKL em
mulheres pré-menopausadas com lúpus : associação com massa óssea e fratura vertebral
/ Alessandra Cerezo Bonfá. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Lupus eritematoso sistêmico 2.Pré-menopausa 3.Osteoprotegerina
4.Ligante RANK 5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Densidade mineral óssea
7.Fraturas da coluna vertebral

USP/FM/DBD-031/14

Dedico esta dissertação à Deus pelo dom da vida e por me abençoar de diversas formas, dentre elas a possibilidade de fazer este mestrado. Ao meu esposo e às minhas quatro famílias que sempre me amaram e me ensinaram os verdadeiros valores e me deram suporte nas vicissitudes da vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosa Pereira, pela dedicação e presença constantes, tão importantes ao longo da aprendizagem e conclusão do Mestrado.

À Profa. Dra. Eloisa Bonfá, pelo apoio incondicional, exemplo e modelo que representa para mim.

À Valéria Caparbo, que além de me ensinar a trabalhar, se mostrou mais que uma amiga, me ajudando em toda caminhada do Mestrado e da vida.

À Dra. Luciana Seguro, que com sua calma e paciência me ajudou e me incentivou ao longo de todo o trabalho.

Às colegas do Laboratório de Metabolismo Ósseo, em especial a Liliam, Claudia e Jackeline, que me ajudaram na realização deste trabalho.

Às meninas da Secretaria da Reumato Claudia, Iná e Martha por todo apoio e amizade ao longo da minha adaptação.

Aos funcionários do Ambulatório e Enfermaria de Reumatologia, em especial a Cris, que me ajudaram na realização desta dissertação.

Ao meu esposo, Thiago, que participou de cada etapa, colaborando com todo o trabalho e sendo meu porto seguro e o meu grande meu amor.

Ao meu pai Sergio, por ser meu herói, minha base e minha vida, que me ajudou me incentivou em cada instante do Mestrado e ao longo da vida.

À minha mãe Rosaida e meus pais de coração, Maria José e Magno, que sempre estiveram ao meu lado em todo momento.

Aos meus irmãos, Ligia e Gabriel, por sempre me apoiarem.

Aos pacientes, indivíduos controles e ao Departamento de Reumatologia, que tornaram possível a realização deste estudo.

"Se depender de mim, nunca ficarei plenamente maduro
nem nas idéias nem no estilo, mas sempre verde,
incompleto, experimental".

Gilberto Freyre

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO 01

2 OBJETIVOS 05

3 REVISÃO DE LITERATURA 07

4 MÉTODOS 16

5 RESULTADOS 23

6 DISCUSSÃO 35

7 CONCLUSÕES 39

8 ANEXOS 41

9 REFERÊNCIAS 43

Apêndices

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LES	Lúpus eritematoso sistêmico
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	Densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X
OP	Osteoporose
GC	Glicocorticoides
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
SLEDAI	Índice de atividade <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SDI	Índice de dano <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index</i>
VFA	Avaliação de Fratura Vertebral (<i>vertebral fracture assessment</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
ISCD	Sociedade Internacional de Densitometria Óssea
sRANKL	RANKL solúvel
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos prévios avaliando polimorfismos do RANKL com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações.....	08
Tabela 2 – Estudos prévios avaliando polimorfismos da OPG com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações.....	10
Tabela 3 – Estudos prévios avaliando polimorfismos do RANK com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações.....	15
Tabela 4 – Características demográficas e antropométricas, densidade mineral óssea, parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose e concentrações séricas de sRANKL/OPG de pacientes e controles.....	27
Tabela 5 – Frequências dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK em pacientes e controles.....	28
Tabela 6 – Frequência dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK de pacientes com e sem fratura vertebral.....	29
Tabela 7 – Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina, níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com e sem fratura vertebral.....	30

Tabela 8 – Análise de regressão logística múltipla para a presença de fraturas vertebrais em pacientes.....	31
---	----

Tabela 9 – Frequência dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK de pacientes lúpicos com baixa densidade mineral óssea (Z-score $\leq -2,0$) e densidade mineral óssea normal (Z-score $> -2,0$).....	32
---	----

Tabela 10 – Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina, níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com densidade mineral óssea normal (Z-score $> -2,0$) e baixa densidade mineral óssea (Z-score $\leq -2,0$).....	33
---	----

Tabela 11 – Análise de regressão logística múltipla para baixa densidade mineral óssea para idade cronológica (Z-score $\leq -2,0$) em pacientes.....	34
--	----

RESUMO

Bonfá AC. *Polimorfismos de nucleotídeo único dos genes do sistema OPG/RANKL em mulheres pré-menopausadas com lúpus: associação com massa óssea e fratura vertebral* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: O aumento da sobrevida dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) foi acompanhado por um aumento da frequência de comorbidades, tais como osteoporose e fraturas. Há descrições de associação de polimorfismos dos genes receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), seu ligante (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) com alterações de densidade e fragilidade óssea, entretanto, não há estudos que avaliam estes polimorfismos em pacientes com LES. **Objetivos:** Avaliar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes RANKL, OPG e RANK em pacientes pré-menopausadas com LES e sua associação com densidade mineral óssea (DMO), fraturas vertebrais e concentrações séricas de sRANKL e OPG. **Métodos:** 211 mulheres com LES na pré-menopausa e 154 controles saudáveis foram avaliadas. Os seguintes SNPs foram avaliados por PCR em tempo real: RANKL [290 A>G (rs2277438)], OPG [1181 G>C (rs2073618), 245 T>G (rs3134069), 163 A>G (rs3102735)] e RANK [A>G (rs3018362)]. Concentrações séricas de OPG e sRANKL foram determinadas por ELISA, DMO e fraturas vertebrais por DXA (densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X). **Resultados:** Pacientes e controles apresentaram frequência semelhante do alelo G do gene RANKL 290 A>G (41,2 vs. 40,3%, p=0,91), do alelo C do gene OPG 1181 G>C (62,6 vs. 61,0%, p=0,83), do alelo G da OPG 245 T>G (21,3 vs. 22,7%, p=0,80) do alelo G da OPG 163 A>G (96,2 vs. 87,0%, p=1,00) e do alelo G do RANK A>G (88,2 vs. 96,8%, p=0,75). Quando analisados os pacientes com LES, a frequência dos genótipos associados AG/GG do gene RANKL 290 A>G foi menos frequente em pacientes com fraturas vertebrais que em pacientes sem fraturas (28,1 vs. 46,9%, p=0,01). Com relação à densidade mineral óssea, a frequência dos genótipos associados TG/GG do polimorfismo 245 T>G da OPG foi maior em pacientes com baixa densidade mineral óssea do que em pacientes com densidade mineral óssea normal (31,4 vs. 18,1%, p=0,04). Não houve associação da DMO/fraturas com polimorfismos da OPG 1181 G>C, OPG 163 A>G e RANK A>G. Também não houve associação dos polimorfismos com as concentrações séricas de sRANKL e OPG. **Conclusões:** O presente trabalho demonstra pela primeira vez que variações genéticas no sistema OPG/RANKL podem desempenhar um papel importante na remodelação óssea e fratura em paciente pré-menopausadas com LES.

Descritores: LES, pré-menopausa, RANKL, OPG, RANK, polimorfismo, DMO, fratura.

SUMMARY

Bonfá AC. Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in premenopausal women with SLE: association with bone mass and vertebral fractures [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Survival rate improvement in systemic lupus erythematosus was accompanied by an increase in the incidence of long-term bone disorders such as osteoporosis, fractures and osteonecrosis. Polymorphisms of receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) genes are known to influence bone mineral density and structure. However, there are no studies assessing these polymorphisms in SLE patients.

Objective: To evaluate receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) genes single nucleotide polymorphisms (SNP) in premenopausal SLE patients and their association with sRANKL and OPG serum levels, vertebral fractures and bone mineral density (BMD).

Methods: 211 premenopausal SLE patients (ACR criteria) and 154 healthy controls were enrolled. SNPs of RANKL [290 A>G (rs2277438)], OPG [1181G>C (rs2073618), 245T>G (rs3134069), 163 A>G (rs3102735)] and RANK [A>G (rs3018362)] were obtained by real-time PCR. sRANKL/OPG serum levels were determined by ELISA. BMD and vertebral fractures were evaluated by dual energy X-ray absorptiometry. **Results:** SLE patients and controls had similar frequency of RANKL 290 G allele (41.2 vs. 40.3%, $p=0.91$), OPG 1181 C allele (62.6 vs. 61.0%, $p=0.83$), OPG 245 G allele (21.3 vs. 22.7%, $p=0.80$), OPG 163 G allele (96.2 vs. 87.0%, $p=1.00$) and RANK G allele (88.2 vs. 96.8%, $p=0.75$). Further analysis of SLE patients revealed that the frequency of RANKL 290 G allele was lower in patients with fractures than in patients without fractures (28.1 vs. 46.9%, $p=0.01$). In addition, the frequency of OPG 245 G allele was higher in patients with low BMD than in patients with normal BMD (31.4 vs. 18.1%, $p=0.04$). No association of OPG 1181 G>C, OPG 163 A>G and RANK A>G SNPs with BMD/fractures were found. Also, no association was observed between RANKL/OPG/RANK SNPs and sRANKL/OPG serum levels. **Conclusions.** Our study provides novel data demonstrating that RANKL/OPG genetic variations seem to play a role in bone remodeling and particularly in its main complication, fracture, in premenopausal patients with SLE.

Descriptors: SLE, premenopausal, RANKL, OPG, RANK, polymorphism, BMD, fracture.

O LES é uma doença autoimune, poligênica e multisistêmica caracterizada pela perda de auto tolerância e inflamação crônica de diversos órgãos, incluindo a pele, rins, sistema nervoso central e sistema musculoesquelético (1). Geralmente o LES afeta mulheres jovens (1-2) e possui uma prevalência de 40 a 250/ 100.000 indivíduos (1). Pacientes com LES apresentam alterações imunológicas levando a produção de anticorpos que podem causar danos citotóxicos ocasionando a deposição de complexos imunes com a ativação do sistema complemento e subsequente inflamação (1). Comorbidades musculoesqueléticas estão presentes em 90% dos pacientes em algum momento durante o curso da doença, estas manifestações incluem artrite, artralgia, mialgias, osteonecrose e osteoporose (OP) (1).

O aumento da sobrevida dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) foi acompanhado por um aumento na frequência de comorbidades, tais como osteoporose e fraturas (3-4). Estas complicações podem ser decorrentes de diversos mecanismos incluindo fatores relacionados à doença, terapia e susceptibilidade genética (4-6).

De fato, pacientes com LES apresentam uma maior frequência de densidade mineral óssea (DMO) reduzida quando comparados à controles saudáveis e mais de 22% das mulheres lúpicas em fase de pré-menopausa têm baixa massa óssea (7) e 20% apresentam fraturas vertebrais (8). Esta redução pode ser explicada por mecanismos decorrentes da doença como: miopatia, falência renal, redução da atividade física devido à artrite, disfunções endócrinas e efeitos sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, levando ao aumento da reabsorção óssea (4,7). Além disso, o aconselhamento para evitar

exposição solar pode induzir a deficiência de vitamina D sendo um fator adicional para a massa óssea reduzida observada nestes pacientes (4,7).

A osteoporose representa uma doença poligênica que é amplamente modificada por fatores ambientais, nutricionais e comportamentais (9-11). A qualidade e integridade estrutural do sistema esquelético é mantida por um processo de remodelamento ósseo, que envolve reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (12-13). O desequilíbrio entre formação e reabsorção podem causar mudanças em diversos sistemas e fatores locais, resultando em doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose (14).

A descoberta do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), do seu ligante (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) permitiram um melhor entendimento da regulação do processo de remodelamento ósseo (11). Quando o RANKL se liga ao RANK, ativa os osteoclastos e inicia o processo de reabsorção óssea, entretanto essa interação pode ser inibida pela OPG (12,15).

No LES, o processo inflamatório secundário à atividade de doença e a terapia com glicocorticoides (GC) podem aumentar a maturação dos osteoclastos e reduzir a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, levando a uma rápida perda de massa óssea (16). Estes fatores podem induzir um aumento da expressão de RANKL e uma diminuição da expressão de OPG com um consequente aumento na reabsorção óssea (16-17).

Polimorfismos nos genes do RANKL, OPG e RANK também podem afetar a transcrição e expressão destas proteínas (12,18), alterando a relação RANKL/OPG e comprometendo o processo de remodelamento ósseo,

resultando na alteração da massa óssea e no risco de fraturas (12). De fato, polimorfismos no gene do RANKL e RANK têm sido descritos associados à baixa massa óssea (19) e risco de fratura (20) na população em geral e polimorfismos no gene da OPG têm sido considerados um fator de risco de susceptibilidade genética para osteoporose pós-menopausa (10,12). Entretanto, não há dados com relação a possível influência dos polimorfismos do RANKL, da OPG e do RANK nas complicações ósseas em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Os polimorfismos avaliados neste trabalho, RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, 245 T>G, 163 A>G e RANK A>G, foram escolhidos por estarem frequentemente associados à DMO e fraturas vertebrais na literatura (10,11,20,22).

2 OBJETIVOS

Avaliar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes RANK, RANKL e OPG em pacientes pré-menopausadas com LES e sua associação com densidade mineral óssea, fraturas vertebrais e concentrações séricas de RANK solúvel (sRANKL) e OPG.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Foi realizada uma revisão bibliográfica de todos os artigos científicos encontrados nos dados de base PubMed, utilizando as seguintes palavras chaves: RANKL, *polymorphism* e *bone*; *receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*, *polymorphism* e *bone*; RANKL, *polymorphism* e *BMD*; *receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*, *polymorphism* e *bone mineral density* (Tabela 1).

Foram encontrados treze artigos que relacionavam o polimorfismo do RANKL e densidade mineral óssea. Destes, 9 (69,2%) apresentavam associação do polimorfismo com DMO e 4 (30,7%) não haviam associação. Com relação a este polimorfismo e fratura vertebral, foram encontrados dois trabalhos, e ambos não apresentaram associação do polimorfismo do gene RANKL com fraturas vertebrais. A discrepância destes resultados pode ser explicada pelo fato de que estes trabalhos avaliaram populações diferentes, em relação à etnia, sexo e status estrogênico. Nenhum destes estudos avaliou pacientes com LES e mulheres em pré-menopausa.

Tabela 1 – Estudos prévios avaliando polimorfismos do RANKL com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações

Ref	População	SNP RANKL	DMO	Fratura Vertebral
21	Mulheres taiwanesas em pós-menopausa	RANKL	SNP do RANKL aumenta o risco para baixa DMO	N/A
22	Mulheres chinesas em peri e pós-menopausa	RANKL	SNPs do RANKL não tiveram associação com DMO	N/A
23	Meta-análise em população descendente de europeus e asiáticos	RANKL	Associado à DMO	N/A

Continua

Continuação				
Ref	População	SNP RANKL	DMO	Fratura Vertebral
24	Pacientes caucasianos com hiperpara-tireoidismo Primário	RANKL 290 A>G	SNP do RANKL não teve associação com DMO	N/A
25	Mulheres chinesas	RANKL	SNP do RANKL não teve associação com DMO	N/A
26	Homens europeus	RANKL	SNP do RANKL esteve associado a marcadores de remodelação óssea. E tendência à associação com DMO de coluna lombar	N/A
27	Mulheres húngaras em pós-menopausa	rs9533156 C>T	O alelo T esteve associado a uma maior DMO na coluna lombar	SNP do RANKL não teve associação com fraturas vertebrais
28	Mulheres em pós-menopausa	RANKL	Os SNPs do RANKL estavam associados à DMO de coluna lombar em mulheres com osteoporose	N/A
19	População descendentes de europeus	RANKL	SNPs do RANKL têm associação com DMO	SNP do RANKL não teve associação com fraturas vertebrais
29	Mulheres coreanas em pós-menopausa	RANKL	SNPs do RANKL não tiveram associação com DMO. Quando o SNP do RANKL estava associado ao SNP do OPG teve relação com a DMO na coluna lombar	N/A
30	População descendentes de europeus	RANKL	SNP do RANKL teve associação com DMO no fêmur total	N/A
31	Mulheres eslovenas em pós-menopausa	RANKL 290 C>T	O genótipo CC estava associado a uma menor DMO que o genótipo TT	N/A
32	Homens adultos	RANKL	SNP do RANKL teve associação com DMO	N/A

Ref.: Referência bibliográfica; SNP RANKL: Polimorfismo de nucleotídeo único do gene ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; DMO: Densidade mineral óssea; N/A: Não Aplicável; OPG: osteoprotegerina

Com relação ao gene da OPG, para a revisão bibliográfica foram utilizadas as seguintes palavras-chave: OPG, *polymorphism* e *bone*; *osteoprotegerin*, *polymorphism* e *bone*; OPG, *polymorphism* e *BMD*; *osteoprotegerin*, *polymorphism* e *bone mineral density* (Tabela 2).

Foram encontrados 32 artigos que avaliaram a relação entre o polimorfismo do gene da OPG com a densidade mineral óssea. Destes, 27 (84,4%) trabalhos comprovaram a associação do polimorfismo da OPG com a DMO, e 6 (18,6%) afirmaram não haver associação do SNP com a DMO. Com relação à fratura vertebral, dos três trabalhos encontrados, 2 (66,7%) afirmaram haver associação do polimorfismo da OPG com fratura vertebral, enquanto 1 (33,3%) afirma não haver associação deste SNP com a fratura. Nestes trabalhos existe uma variação muito grande da população estudada, com relação à doenças, etnia e sexo. Os trabalhos que envolviam o sexo feminino, todos incluíram mulheres em fase de pós-menopausa, dificultando a interpretação dos achados, já que o fator hormonal tem uma grande ação no metabolismo ósseo. Novamente, nenhum destes estudos avaliou pacientes com LES e mulheres em pré-menopausa.

Tabela 2 – Estudos prévios avaliando polimorfismos da OPG com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações

Ref	População	SNP OPG	DMO	Fratura Vertebral
33	Mulheres chinesas em pós-menopausa	19163A>G	Indivíduos com genótipo AA apresentaram uma DMO maior	N/A
Continua				

Continuação

Ref	População	SNP OPG	DMO	Fratura Vertebral
34	Meta-análise	245 T>G 1181 G>C 149 T>C 163 A>G 209 G>A 950 T>C 1217 C>T	O alelo C do SNP da OPG G1181C tem risco diminuído para a osteoporose. O alelo G do SNP da OPG A163G pode estar associado a um maior risco de osteoporose. Estes resultados foram observados em mulheres em pós-menopausa	N/A
35	Mulheres chinesas em pós-menopausa	18861A>G	Indivíduos com genótipo AA apresentaram uma DMO maior	N/A
36	Mulheres chinesas em pós-menopausa	19190C>A	Indivíduos com genótipo CC apresentaram uma DMO maior	N/A
37	Mulheres chinesas em pós-menopausa	19124G>A	Indivíduos com genótipo GG apresentaram uma DMO maior	N/A
38	Mulheres chinesas em pós-menopausa	23367 T>C	Indivíduos com genótipo TT apresentaram uma DMO maior	N/A
39	Mulheres chinesas em pós-menopausa	23276 G>A	Indivíduos com genótipo GG apresentaram uma DMO maior. O alelo A esteve associado à baixa DMO e maior risco de osteoporose	N/A
23	Meta-análise em população descendente de europeus e asiáticos	OPG	SNPs da OPG estão associados à DMO	N/A
24	Pacientes caucasianos com hiperpara-tireoidismo Primário	245 T>G 163 A>G 1181 G>C	Indivíduos com genótipo GG dos SNPs de OPG 163 A>G e 245 T>G apresentaram uma menor DMO	N/A
40	Mulheres em pós-menopausa	OPG	SNPs da OPG aumentam o risco de osteoporose	N/A
41	Mulheres com sintomas de doença arterial coronariana em pós-menopausa	245 T>G 1181 G>C 209 C>T	Indivíduos com genótipo AA do OPG 245 T>G apresentaram DMO normal.	N/A

Continua

Continuação

Ref	População	SNP OPG	DMO	Fratura Vertebral
42	Mulheres em pós-menopausa	245 T>G 1181 G>C	SNPs da OPG estão associados à DMO	N/A
43	Meta-análise em população caucasiana	OPG	Confirmou a associação da OPG com a DMO	N/A
26	Homens europeus	1181 G>C	O alelo C estava associado a marcadores de remodelação óssea e baixa DMO na coluna lombar	N/A
27	Mulheres húngaras em pós-menopausa	OPG	SNPs da OPG estão associados à DMO	SNP da OPG não teve associação com fraturas vertebrais
44	Meninas com escoliose idiopática juvenil	245 T>G 1181 G>C 163 A>G 209 C>T	Indivíduos com genótipo CC da OPG 1181 G>C apresentaram maior DMO na coluna lombar	N/A
45	Meta-análise em população descendente de europeus e asiáticos	1181 G>C	Indivíduos com genótipo GG da OPG 1181 G>C apresentaram baixa DMO na coluna lombar de europeus e asiáticos. E baixa DMO em colo de fêmur e fêmur total somente em europeus	N/A
46	Mulheres espanholas em pós-menopausa	OPG	SNPs da OPG estão associados à DMO	N/A
47	População heterogênea	OPG	SNPs da OPG e interação com outros genes de outros SNPs estão associados à DMO	N/A
19	População descendentes de europeus	OPG	SNPs da OPG estão associados à DMO	SNPs da OPG estão associados à fratura vertebral
48	Mulheres espanholas em pré e pós-menopausa	1181 G>C 163 A>G	Indivíduos com genótipo CC da OPG 1181 G>C apresentaram maior DMO na coluna lombar em mulheres em pré-menopausa	N/A

Continua

Continuação

Ref	População	SNP OPG	DMO	Fratura Vertebral
29	Mulheres coreanas em pós-menopausa	1181 G>C 245 T>G 163 A>G 209 C>T	Indivíduos com genótipo CC da OPG 1181 G>C apresentaram maior DMO na coluna lombar	N/A
49	Mulheres idosas australianas	1181 G>C 163 A>G 950 T>C	Não foi encontrada nenhuma associação significativa dos SNPs de OPG com DMO	N/A
50	Mulheres maltesas em pós-menopausa	OPG	Não foi encontrada nenhuma associação significativa dos SNPs de OPG com DMO	N/A
51	População heterogênea	163 A>G	Indivíduos com genótipo GG da OPG 163 A>G apresentaram maior DMO	N/A
52	Mulheres coreanas em pós-menopausa	1181 G>C 163 A>G	Indivíduos com genótipo CC da OPG 1181 G>C apresentaram maior DMO	N/A
53	Mulheres eslovenas em pós-menopausa	OPG	Indivíduos com genótipo GG da OPG 1181 G>C apresentaram baixa DMO na coluna lombar	N/A
54	Mulheres dinamarquesas em pós-menopausa	163 A>G	SNP da OPG 163 A>G influenciam a massa óssea independente dos níveis séricos de OPG solúvel	N/A
55	Mulheres idosas suecas	950 T>C	Não foi encontrada nenhuma associação significativa do SNP de OPG com DMO	N/A
12	Mulheres com osteoporose em pós-menopausa	245 T>G 209 G>A 889 C>T 950 T>C	SNPs dos OPGs 245 T>G e 209 G>A estiveram associados à DMO	N/A
55	População japonesa	OPG	Não foi encontrada nenhuma associação significativa dos SNPs de OPG com DMO	N/A

Continua

Continuação

Ref	População	SNP OPG	DMO	Fratura Vertebral
10	Pacientes com osteoporose	1181 G>C 245 T>G 163 A>G 950 T>C 6890 A>C	O alelo G da OPG 245 T>G era mais frequente em pacientes com osteoporose	O alelo G das OPGs 245 T>G e 163 A>G era mais frequente em pacientes com fraturas vertebrais
57	Mulheres irlandesas em pré e pós-menopausa	1181 G>C 950 T>C	Indivíduos com alelo C da OPG 1181 G>C apresentaram baixa DMO na coluna lombar e colo de fêmur	N/A

Ref.: Referência bibliográfica; SNP OPG: Polimorfismo de nucleotídeo único do gene osteoprotegerina; DMO: Densidade mineral óssea; N/A: Não Aplicável

Com relação ao gene do RANK, para a revisão bibliográfica foram utilizadas as seguintes palavras-chave: RANK, *polymorphism* e *bone; receptor activator of nuclear factor-kappa B, polymorphism* e *bone*; RANK, *polymorphism* e *BMD*; *receptor activator of nuclear factor-kappa B, polymorphism* e *bone mineral density* (Tabela 3).

Neste levantamento, foram encontrados 11 trabalhos que avaliaram a relação do polimorfismo do gene RANK e a densidade mineral óssea. Destes, 8 (72,7%) trabalhos apresentaram associação do polimorfismo do RANK com a DMO, e 3 (27,3%) comprovaram não haver associação. Com relação às fraturas vertebrais, somente um artigo avaliou este polimorfismo na fratura vertebral, e comprovou que o polimorfismo do gene RANK está associado às fraturas vertebrais em uma população descendente de europeus. A discrepância destes resultados pode ser explicada pelo fato de que estes trabalhos avaliaram populações diferentes, em relação à etnia, sexo e status estrogênico. Nenhum destes estudos avaliou pacientes com LES e mulheres em pré-menopausa.

Tabela 3 – Estudos prévios avaliando polimorfismos do RANK com relação à DMO e presença de fraturas vertebrais em diversas populações

Ref.	População	SNP RANK	DMO	Fratura Vertebral
58	Mulheres turcas em pós-menopausa	RANK	Não houve associação dos polimorfismos com a DMO	N/A
21	Mulheres chinesas em peri e pós-menopausa	RANK	SNP do RANK está associado principalmente com DMO de colo de fêmur	N/A
19	População descendentes de europeus	RANK	Associado à DMO	Associado à fraturas
26	Homens europeus	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A
59	Mulheres em pós-menopausa	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A
60	Homens europeus	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A
29	Mulheres coreanas em pós-menopausa	RANK	SNP do RANK não teve associação com DMO.	N/A
61	Mulheres coreanas em pós-menopausa	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A
30	População descendentes de europeus	RANK	SNPs do RANK têm associação com DMO	N/A
32	Homens adultos	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A
52	Mulheres coreanas em pós-menopausa	RANK	SNP do RANK está associado com DMO	N/A

Ref.: Referência bibliográfica; SNP RANK: Polimorfismo de nucleotídeo único do gene do receptor ativador do fator nuclear kappa B; DMO: Densidade mineral óssea; N/A: Não Aplicável

4 MÉTODOS

Foram estudadas 211 pacientes pré-menopausadas com Lúpus Eritematoso Sistêmico segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (57), seguidas de Janeiro de 2011 a Janeiro de 2012 no Ambulatório de Lúpus do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os critérios de exclusão foram menopausa, amenorreia secundária, histórico de disfunção da tireoide, clearance de creatinina <60 ml/min, uso de medicação com ação no metabolismo ósseo (bisfosfonatos e teriparatida), gestação no momento da avaliação e sintomas clínicos de má absorção gastrointestinal (diarreia crônica, fezes volumosas, inchaço, cólica e gases). A pré-menopausa foi confirmada pela presença de ciclos menstruais regulares ou pelos níveis de gonadotrofinas.

Onze (5%) pacientes se recusaram a participar deste estudo, com a justificativa de que não teriam tempo de fazer todos os exames.

A atividade e danos da doença foram avaliados respectivamente pelo SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (62) e pelo SDI (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index*) (63). Dados adicionais dos pacientes, como doses de glicocorticoides, foram obtidos por revisão de prontuário médico da base de dados eletrônica do Hospital das Clínicas pelo período de nove anos anterior ao estudo.

Um total de 154 mulheres saudáveis, estudantes da Universidade de São Paulo ou funcionárias do Hospital das Clínicas, foram incluídas como grupo controle. As voluntárias para grupo controle foram submetidas a uma triagem onde foram analisados a DMO e VFA (*vertebral fracture assessment*)

por DXA (densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X). Fatores de exclusão foram gravidez, menopausa, histórico de doenças crônicas incluindo disfunção da tireoide, diabetes, insuficiência renal ou hepática, e uso de medicação com ação no metabolismo ósseo (bisfosfonatos e teriparatida).

Também foram excluídas controles com baixa densidade mineral óssea para a idade cronológica age (Z-score $\leq -2,0$) (64), qualquer grau de deformidade pelo VFA ou histórico de fratura por fragilidade definido por fratura na costela, antebraço, úmero e fêmur na idade adulta, ocorrido durante atividades normais, como queda da própria altura ou menos (65).

Foram registrados dados antropométricos de ambos os grupos, incluindo idade, peso e altura. Por meio de questionário foram avaliados idade da menarca, história pessoal e familiar de fratura, tabagismo atual, etilismo (considerado significativo se $\geq 3U/dia$), ingestão diária de cálcio (alimentos e/ou suplementação) e frequência e intensidade de atividade física (pelo menos 3 vezes por semana nos últimos 6 meses) (17).

Todos os indivíduos aceitaram fazer parte do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

Densidade Mineral Óssea (DMO)

A densidade mineral óssea foi avaliada por DXA (densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X), usando o densitômetro Hologic (Hologic Inc. Bedford, MA, EUA, modelo Discovery). As medidas de DMO de todos pacientes e controles foram realizadas por um único técnico experiente no mesmo equipamento. Vértexes anatomicamente anormais foram excluídas da

análise conforme as recomendações da ISCD (Sociedade Internacional de Densitometria Óssea). Os erros de precisão para medidas de DMO foram determinados baseados nos protocolos da ISCD (64). A DMO expressa em g/cm^2 foi avaliada na coluna lombar (L1-L4), colo do fêmur e fêmur total. Foi considerada baixa densidade mineral óssea os pacientes que apresentaram Z-score $\leq -2,0$ na coluna e/ou no fêmur total e densidade mineral óssea normal, indivíduos que apresentaram Z-score $> -2,0$ (64). Coeficientes de variação para a DMO foram de 0,7% para coluna lombar (L1-L4), 1,2% para fêmur total e 1,5% para colo de fêmur.

Composição corporal, incluindo massa magra, massa gorda, porcentagem de gordura e conteúdo mineral ósseo foi medido utilizando o mesmo equipamento de densitometria óssea (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, USA) pela DXA.

Avaliação de Fratura Vertebral (VFA, *vertebral fracture assessment*) pela DXA

A fratura vertebral foi avaliada por dois reumatologistas, (LPCS, RMRP) que têm experiência nesta área, baseados nos protocolos da ISCD (64) utilizando o software do mesmo densitômetro (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, USA) na região de T5 a L4. A concordância entre os reumatologistas foi alta, com coeficiente kappa de 0,78. Um consenso foi alcançado para divergências de interpretação. VFA foi classificada usando o método visual semiquantitativo (SQ) de *Genant*, no qual fratura leve (grau 1) é uma redução de 20–25% na altura vertebral (anterior, média e/ou posterior), moderada (grau 2) uma redução de 26–40% e grave (grau 3) uma redução de mais de 40% (66,67).

Concentrações Séricas de sRANKL e OPG

Amostras de soro para medir as concentrações de RANKL solúvel (sRANKL) e OPG foram coletadas de pacientes e controles e armazenadas a -80°C para posterior realização dos ensaios. As concentrações séricas de sRANKL (ampli-sRANKL, ELISA; Biomedica, Vienna, Austria) e de OPG (Osteoprotegerin, ELISA; Biomedica, Vienna, Austria) foram determinadas através de técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) seguindo orientações do fabricante. Coeficiente de variação inter e intra-ensaio para sRANKL foi de 3,9% e 1,3%, e para OPG foi de 6,2% e 1,1%, respectivamente. Amostras de 178 pacientes e 124 controles foram consecutivamente selecionadas para ser testadas em duplicata. O limite de detecção estabelecido pelo fabricante para sRANKL foi (0 pmol/l +3 DP): 0,02 pmol/l e para a OPG foi (0 pmol/l +3 DP) 0,14 pmol/l. Níveis séricos de sRANKL foram indetectáveis em 46,6% dos pacientes e 50,8% dos controles. Níveis séricos de OPG foram detectados em todos pacientes e controles.

Genotipagem dos SNPs

O DNA analisado foi obtido através de leucócitos de sangue periférico. Foram coletados 10 ml de sangue, usando-se EDTA como anticoagulante. O DNA foi extraído pela técnica de *salting-out* (68) e o material armazenado em freezer - 70°C até sua utilização.

A genotipagem dos SNPs foi avaliada por discriminação alélica, utilizando ensaio TaqMan de genotipagem de SNP (Applied Biosystems, Foster City, CA) em equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied

Biosystems, Foster City, CA). Aproximadamente 10ng de DNA genômico foi amplificado em placa de 96 poços na presença de 1X TaqMan genotipagem de SNP assay e 1X PCR TaqMan universal master mix (Applied Biosystems), nas seguintes condições de termociclagem: aquecimento a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 92°C por 15 seg e 60°C por 1 min.

Foram avaliados polimorfismos nos genes RANKL [290 A>G (rs2277438) (localização cromossômica 13q14)], OPG (8q24) [245 T>G (rs3134069), 1181 G>C (rs2073618), 163 A>G (rs3102735)] e RANK (18p21) [A>G (rs3018362)] em todos os participantes. Para checar a qualidade da genotipagem, 30 amostras (8,2%) foram analisadas duas vezes (16), e os resultados mostram 98% de concordância. Amostras divergentes foram analisadas três vezes e os resultados concordantes foram apresentados.

Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão ou porcentagem. Teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para verificar a distribuição normal das variáveis (69). Pacientes e controles foram comparados usando o teste t-student, Mann-Whitney, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Os pacientes foram divididos de acordo com a presença ou ausência de baixa densidade mineral óssea e fraturas vertebrais e comparados usando teste t-student, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Modelos de regressão logística foram usados para analisar quais fatores foram independentemente associados com fraturas vertebrais e baixa densidade mineral óssea, incluindo todas as variáveis com valor de $p < 0,10$ na análise bivariada de cada modelo. O teste

Hosmer e Lameshow (70) foi usado para verificar a qualidade do ajuste do modelo de regressão logística.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado em pacientes e controles para todos os polimorfismos, usando o teste qui-quadrado.

O software utilizado foi o SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Os resultados significativos foram considerados aqueles com $p < 0,05$.

O poder estatístico foi de 71% (IC95%) baseado no número da amostra e número de pacientes. Como este estudo avaliou uma amostra de conveniência, o poder de cálculo se refere ao objetivo primário, que foi a diferença observada na frequência do polimorfismo do RANKL 290 A>G e a presença de fraturas vertebrais.

Aprovação pela Comissão de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas (protocolo de pesquisa 0221/10) e todos os participantes leram, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Pacientes e controles

Características demográficas e antropométricas, densidade mineral óssea, parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose e concentrações séricas de sRANKL e OPG de pacientes e controles estão apresentados na Tabela 4.

Pacientes tinham idade média de início da doença de $25,9 \pm 7,0$ anos, duração da doença de $7,5 \pm 6,1$ anos, SDI de $0,66 \pm 0,85$ e SLEDAI no ano anterior ao estudo de $1,9 \pm 2,1$. No momento do estudo, 75,4% pacientes estavam tomando prednisona com dose média de $14,4 \pm 15,7$ mg/dia. Em relação ao uso prévio de glicocorticoide, a dose máxima de prednisona foi de $44,3 \pm 20,9$ mg, a dose média foi $17,5 \pm 15,7$ mg/dia e a dose cumulativa foi $28,6 \pm 22,1$ g.

Concentrações séricas de sRANKL e OPG foram dosadas em 178 pacientes e em 124 controles e foi similar em ambos os grupos (Tabela 4).

Análise dos polimorfismos

A distribuição da frequência alélica na população estudada (n=365) estava em equilíbrio Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos analisados: RANKL 290 A>G ($X^2= 1,06$; $p= 0,30$), OPG 1181 G>C ($X^2= 3,19$; $p= 0,07$), OPG 245 T>G ($X^2= 0,80$; $p= 0,37$), OPG 163 A>G ($X^2=0,04$; $p= 0,84$) e RANK A>G ($X^2= 1,5$; $p= 0,22$).

A frequência genotípica dos SNPs de RANKL, OPG e RANK foi semelhante em pacientes e controles para os cinco polimorfismos (Tabela 5). A distribuição dos genótipos nos SNPs dos pacientes foi: RANKL 290 A>G AA:AG:GG = 124:74:13, OPG 1181 G>C GG:GC:CC = 79:97:35, OPG 245

T>G TT: TG: GG = 166:44:1, OPG 163 A>G AA: AG: GG = 8:66:137 e RANK A>G AA: AG: GG = 25:86:100. No grupo controle observou-se a seguinte distribuição: RANKL 290 A>G AA: AG: GG = 92:60:2, OPG 1181 G>C GG: GC: CC = 60:62:32, OPG 245 T>G TT: TG: GG = 119:33:2, OPG 163 A>G AA: AG: GG = 5:49:100 e RANK A>G AA: AG: GG = 20:65:69.

Pacientes com fraturas vertebrais vs. pacientes sem fraturas vertebrais

Sessenta e quatro (30,3%) pacientes tinham fratura vertebral, todas de grau leve (grau 1). Dentre elas, 35 (54,7%) pacientes tiveram somente uma fratura vertebral, 21 (32,8%) apresentaram duas, seis (9,4%) pacientes tinham três, uma (1,6%) paciente tinha quatro e uma paciente (1,6%) tinha 5 fraturas vertebrais. A localização das fraturas vertebrais está descrita a seguir: L4 em 22 (34,4%) pacientes, L3 em 29 (45,3%) pacientes, L2 em 14 (21,9%), L1 em 11 (17,2%), T12 em 10 (15,6%), T11 em 9 (14,1%), T10 em 5 (7,8%), T9 em 4 (6,3%) e T6 em 1 (1,6%) paciente. A frequência dos genótipos associados AG/GG do RANKL 290 foi menor em pacientes com fratura vertebral do que em pacientes sem fratura vertebral ($p=0,011$). Não houve diferença na frequência genotípica dos outros quatro polimorfismos analisados de acordo com a presença de fratura vertebral (Tabela 6).

Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina, níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com e sem fratura vertebral são apresentados na Tabela 7. O modelo de regressão

logística para a presença de fraturas vertebrais em pacientes está apresentado na Tabela 8.

Pacientes com baixa densidade mineral óssea vs. pacientes com densidade mineral óssea normal

Cinquenta e um (24,2%) pacientes apresentaram baixa densidade mineral óssea para a idade cronológica na coluna lombar e/ou quadril. A frequência dos genótipos associados TG/GG do OPG 245 foi maior em pacientes com baixa DMO do que em pacientes com DMO normal ($p=0,044$). Não houve diferença na frequência genotípica dos outros quatro polimorfismos analisados de acordo com a DMO (Tabela 9).

Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina, níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com densidade mineral óssea normal ($Z\text{-score} > -2,0$) e baixa densidade mineral óssea ($Z\text{-score} \leq -2,0$) são apresentados na Tabela 10. O modelo de regressão logística para baixa densidade mineral óssea para idade cronológica ($Z\text{-score} \leq -2,0$) em pacientes está apresentado na Tabela 11.

Tabela 4 – Características demográficas e antropométricas, densidade mineral óssea, parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose e concentrações séricas de sRANKL/OPG de pacientes e controles

	LES (n = 211)	Controles (n = 154)	<i>P</i>
Idade, anos	33,3 ± 7,3	32,1 ± 7,2	0,114
Peso, kg	68,4 ± 14,2	65,9 ± 14,7	0,098
Altura, m	1,59 ± 0,06	1,61 ± 0,06	0,001
DMO coluna lombar, g/cm²	0,955 ± 0,122	1,007 ± 0,096	<0,001
DMO colo de fêmur, g/cm²	0,791 ± 0,126	0,817 ± 0,116	0,039
DMO fêmur total, g/cm²	0,883 ± 0,119	0,925 ± 0,111	0,001
Conteúdo mineral ósseo, kg	2,01 ± 0,28	2,06 ± 0,28	0,074
Massa gorda, kg	24,86 ± 9,18	22,50 ± 9,05	0,016
Massa magra, kg	41,58 ± 6,21	41,05 ± 6,40	0,426
Porcentagem de gordura, %	35,3 ± 6,5	33,5 ± 6,1	0,006
Idade menarca, anos	12,8 ± 1,6	12,5 ± 1,4	0,023
Histórico familiar de fratura, n (%)	38 (18,0)	8 (5,2)	<0,001
Histórico familiar de OP, n (%)	31 (14,7)	17 (11,0)	0,349
Histórico pessoal de fratura, n (%)	29 (13,7)	11 (7,1)	0,061
Tabagismo, n (%)	19 (9,0)	13 (8,4)	1,000
Ingestão de cálcio, mg/dia	660,3 ± 505,1	409,4 ± 201,4	<0,001
Suplementação de cálcio, n (%)	57 (27,0)	0	<0,001
Exercício físico regular, n (%)	51 (24,2)	72 (46,8)	<0,001
sRANKL, pmol/L, n= 178/124	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,781
OPG, pmol/L, n= 178/124	5,1 ± 3,1	4,6 ± 2,1	0,100
sRANKL/OPG, n= 178/124	0,059 ± 0,141	0,062 ± 0,152	0,888

Dados expressos em média ± desvio padrão ou número (porcentagem)

DMO: densidade mineral óssea; OP: osteoporose; sRANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) solúvel; OPG: osteoprotegerina

Tabela 5 – Frequências dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK em pacientes e controles

	Genótipo	LES (n = 211)	Controles (n = 154)	<i>P</i>
RANKL 290 A>G	AA	124 (58,8)	92 (59,7)	0,937
	AG/GG	87 (41,2)	62 (40,3)	
OPG 1181G>C	GG	79 (37,4)	60 (39,0)	0,852
	GC/CC	132 (62,6)	94 (61,0)	
OPG 245 T>G	TT	166 (78,7)	119 (77,3)	0,848
	TG/GG	45 (21,3)	35 (22,7)	
OPG 163 A>G	AA	8 (3,8)	5 (3,2)	0,782
	AG/GG	203 (96,2)	149 (96,8)	
RANK A>G	AA	25 (11,8)	20 (13,0)	0,869
	AG/GG	186 (88,2)	134 (87,0)	

Dados expressos em número (porcentagem)

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina, RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa B

Tabela 6 – Frequência dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK de pacientes com e sem fratura vertebral

	Genótipo	LES	LES	<i>P</i>
		Com fratura vertebral (n = 64)	Sem fratura vertebral (n = 147)	
RANKL 290 A>G	AA	46 (71,9)	78 (53,1)	0,011
	AG/GG	18 (28,1)	69 (46,9)	
OPG 1181 G>C	GG	23 (35,9)	56 (38,1)	0,876
	GC/CC	41 (64,1)	91 (61,9)	
OPG 245 T>G	TT	48 (75,0)	118 (80,3)	0,390
	TG/GG	16 (25,0)	29 (19,7)	
OPG 163 A>G	AA	0 (0,0)	8 (5,4)	0,109
	AG/GG	64 (100,0)	139 (94,6)	
RANK A>G	AA	7 (10,9)	18 (12,2)	0,787
	AG/GG	57 (89,1)	129 (87,8)	

Dados expressos em número (porcentagem)

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa B

Tabela 7 – Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina, níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com e sem fratura vertebral

Variável	Fratura vertebral		Total (n = 211)	P
	Com (n = 64)	Sem (n = 147)		
Idade, anos	35,6 ± 7,3	32,3 ± 7,0	33,3 ± 7,3	0,002
Duração doença, anos	7,6 ± 5,2	7,5 ± 6,5	7,6 ± 6,1	0,939
IMC, kg/m ²	27,1 ± 4,8	27,0 ± 5,4	27,0 ± 5,2	0,918
SLEDAI Cumulativo* (média)	2,5 ± 1,7	2,4 ± 2,2	2,4 ± 2,1	0,726
SDI	0,7 ± 1,1	0,6 ± 0,7	0,7 ± 0,9	0,534
Uso de GC no momento, n (%)	45 (70,3)	114 (77,6)	159 (75,4)	0,262
Dose de GC no momento, mg	12,2 ± 14,7	15,4 ± 16,0	14,4 ± 15,7	0,175
Dose máxima de GC prévia*, mg	44,9 ± 21,0	44,0 ± 20,9	44,3 ± 20,9	0,759
Dose média de GC prévia*, mg	15,0 ± 13,3	18,7 ± 16,6	17,5 ± 15,7	0,089
Dose cumulativa* de GC, g	28,8 ± 20,8	28,5 ± 22,7	28,6 ± 22,1	0,926
DMO coluna lombar, g/cm ²	0,955 ± 0,114	0,955 ± 0,125	0,955 ± 0,122	0,992
DMO colo de fêmur, g/cm ²	0,810 ± 0,144	0,780 ± 0,117	0,790 ± 0,126	0,217
DMO fêmur total, g/cm ²	0,890 ± 0,119	0,880 ± 0,118	0,880 ± 0,119	0,456
Conteúdo mineral ósseo, kg	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	0,748
Massa gorda, kg	24,5 ± 8,9	25,0 ± 9,3	24,9 ± 9,2	0,735
Massa magra, kg	41,7 ± 5,8	41,5 ± 6,4	41,6 ± 6,2	0,801
Porcentagem de gordura, %	35,0 ± 6,9	35,5 ± 6,3	35,3 ± 6,5	0,623
Idade menarca, anos	12,8 ± 1,6	12,9 ± 1,6	12,8 ± 1,6	0,802
Histórico familiar de fratura, n (%)	9 (14,1)	29 (19,7)	38 (18,0)	0,325
Histórico familiar de OP, n (%)	11 (17,2)	20 (13,6)	31 (14,7)	0,499
Histórico pessoal de fratura, n (%)	9 (14,1)	20 (13,6)	29 (13,7)	0,929
Tabagismo, n (%)	6 (9,4)	13 (8,8)	19 (9,0)	0,901
Ingestão de cálcio, mg/dia	714,6 ± 519,9	636,7 ± 498,5	660,3 ± 505,1	0,305
Suplementação de cálcio, n (%)	20 (31,2)	37 (25,2)	57 (27,0)	0,361
Exercício físico regular, n (%)	14 (21,9)	37 (25,2)	51 (24,2)	0,607
Uso de Cloroquina, n (%)	52 (81,2)	103 (70,1)	155 (73,5)	0,091
Níveis séricos de 25OHD, ng/ml	24,4 ± 9,1	25,1 ± 8,4	24,6 ± 8,9	0,580
25OHD < 30 ng/ml	106 (72,1)	48 (75,0)	154 (73,0)	0,737
25OHD < 20 ng/ml	48 (32,7)	17 (26,6)	65 (30,8)	0,420
25OHD < 10 ng/ml	3 (2,0)	1 (1,6)	4 (1,9)	1,000
RANKL 290 A>G	18 (28,1)	69 (46,9)	87 (41,2)	0,011
OPG 1181 G>C	56 (87,5)	120 (81,6)	176 (83,4)	0,292
OPG 245 T>G	16 (25,0)	29 (19,7)	45 (21,3)	0,390
OPG 163 A>G	64 (100,0)	139 (94,6)	203 (96,2)	0,109
RANK A>G	57 (89,1)	129 (87,8)	186 (88,2)	0,787

Dados expressos em média±DP ou número (porcentagem)

*Últimos 9 anos; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; GC: glicocorticoide; DMO: densidade mineral óssea; OP: osteoporose; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa B

Tabela 8 – Análise de regressão logística múltipla para a presença de fraturas vertebrais em pacientes

Variável	OR	IC (95%)	<i>P</i>
Idade, anos	1,07	1,021 – 1,112	0,004
RANKL 290 A>G	0,45	0,235 – 0,860	0,016

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B;

Tabela 9 – Frequência dos genótipos associados dos polimorfismos de RANKL, OPG e RANK de pacientes lúpicos com baixa densidade mineral óssea (Z-score $\leq$ -2,0) e densidade mineral óssea normal (Z-score $>$ -2,0)

	Genótipo	LES Z-score $\leq$ -2,0 (n = 51)	LES Z-score $>$ -2,0 (n = 160)	P
RANKL 290 A>G	AA	32 (62,7)	92 (57,5)	0,508
	AG/GG	19 (37,3)	68 (42,5)	
OPG 1181 G>C	GG	22 (43,1)	57 (35,6)	0,424
	GC/CC	29 (56,9)	103 (64,4)	
OPG 245 T>G	TT	35 (68,6)	131 (81,9)	0,044
	TG/GG	16 (31,4)	29 (18,1)	
OPG 163 A>G	AA	3 (5,9)	5 (3,1)	0,404
	AG/GG	48 (94,1)	155 (96,9)	
RANK A>G	AA	7 (13,7)	18 (11,3)	0,634
	AG/GG	44 (86,3)	142 (88,8)	

Dados expressos em número (porcentagem)

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina; RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa B

Tabela 10 – Características demográficas e antropométricas, índices SLEDAI e SDI, dados de uso de glicocorticoide, densitometria óssea e parâmetros de composição corporal, fatores de risco para osteoporose, uso de cloroquina níveis séricos de 25OHD e frequência dos SNPs de RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G e RANK A>G em pacientes com densidade mineral óssea normal (Z-score > -2,0) e baixa densidade mineral óssea (Z-score ≤ -2,0)

Variável	Densidade Mineral Óssea		Total (n = 211)	P
	Z-score ≤ -2,0 (n = 51)	Z-score > -2,0 (n = 160)		
Idade, anos	30,7 ± 6,5	34,1 ± 7,3	33,3 ± 7,3	0,003
Duração doença, anos	6,5 ± 6,0	7,9 ± 6,1	7,6 ± 6,1	0,142
IMC, kg/m ²	26,3 ± 5,1	27,2 ± 5,2	27,0 ± 5,2	0,233
SLEDAI Cumulativo* (média)	2,4 ± 2,2	2,5 ± 2,0	2,4 ± 2,1	0,889
SDI	0,6 ± 0,8	0,7 ± 0,9	0,7 ± 0,9	0,728
Uso de GC no momento, n (%)	45 (88,2)	114 (71,2)	159 (75,4)	0,014
Dose de GC no momento, mg	16,0 ± 14,8	13,9 ± 16,0	14,4 ± 15,7	0,412
Dose máxima de GC prévia*, mg	47,8 ± 18,8	43,1 ± 21,5	44,3 ± 20,9	0,162
Dose média de GC prévia*, mg	20,9 ± 15,1	16,5 ± 15,8	17,5 ± 15,7	0,077
Dose cumulativa* de GC, g	32,4 ± 25,5	27,4 ± 20,8	28,6 ± 22,1	0,160
DMO coluna lombar, g/cm ²	0,821 ± 0,065	0,998 ± 0,103	0,955 ± 0,122	<0,001
DMO colo de fêmur, g/cm ²	0,680 ± 0,079	0,830 ± 0,116	0,790 ± 0,126	<0,001
DMO fêmur total, g/cm ²	0,770 ± 0,082	0,920 ± 0,107	0,880 ± 0,119	<0,001
Conteúdo mineral ósseo, kg	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	<0,001
Massa gorda, kg	23,3 ± 8,2	25,4 ± 9,5	24,9 ± 9,2	0,165
Massa magra, kg	39,4 ± 5,4	42,3 ± 6,3	41,6 ± 6,2	0,004
Porcentagem de gordura, %	35,2 ± 6,3	35,4 ± 6,5	35,3 ± 6,5	0,897
Idade menarca, anos	12,6 ± 1,7	12,9 ± 1,6	12,8 ± 1,6	0,198
Histórico familiar de fratura, n (%)	10 (19,6)	28 (17,5)	38 (18,0)	0,733
Histórico familiar de OP, n (%)	7 (13,7)	24 (15,0)	31 (14,7)	0,823
Histórico pessoal de fratura, n (%)	4 (7,8)	25 (15,6)	29 (13,7)	0,160
Tabagismo, n (%)	5 (9,8)	14 (8,8)	19 (9,0)	0,783
Ingestão de cálcio, mg/dia	732,2 ± 512,0	637,4 ± 502,4	660,3 ± 505,1	0,244
Suplementação de cálcio, n (%)	16 (31,4)	41 (25,6)	57 (27,0)	0,421
Exercício físico regular, n (%)	12 (23,5)	39 (24,4)	51 (24,2)	0,902
Uso de Cloroquina, n (%)	37 (72,5)	118 (73,8)	155 (73,5)	0,866
Níveis séricos de 25OHD, ng/ml	24,4 ± 8,4	25,3 ± 10,2	24,6 ± 8,9	0,563
25OHD < 30 ng/ml	120 (75,0)	34 (66,7)	154 (73,0)	0,278
25OHD < 20 ng/ml	52 (32,5)	13 (25,5)	65 (30,8)	0,388
25OHD < 10 ng/ml	2 (1,3)	2 (3,9)	4 (1,9)	0,247
RANKL 290 A>G	19 (37,3)	68 (42,5)	87 (41,2)	0,508
OPG 1181 G>C	42 (82,4)	134 (83,8)	176 (83,4)	0,815
OPG 245 T>G	16 (31,4)	29 (18,1)	45 (21,3)	0,044
OPG 163 A>G	48 (94,1)	155 (96,9)	203 (96,2)	0,404
RANK A>G	44 (86,3)	142 (88,8)	186 (88,2)	0,634

Dados expressos em média±DP ou número (porcentagem)

*Últimos 9 anos; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; GC: glicocorticoide; DMO: densidade mineral óssea; OP: osteoporose; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa B

Tabela 11 – Análise de regressão logística múltipla para baixa densidade mineral óssea para idade cronológica (Z-score $\leq -2,0$) em pacientes

Variável	OR	IC (95%)	<i>P</i>
Idade, anos	0,96	0,923 – 1,007	0,102
Uso de GC no momento, n (%)	3,97	1,514 – 10,412	0,005
OPG 245 T>G	2,14	1,017 – 4,500	0,045
Massa magra, kg	0,97	0,933 – 1,006	0,099

GC: glicocorticoide; OPG: osteoprotegerina

O presente estudo demonstrou que polimorfismos nos genes do RANKL e da OPG influenciam o metabolismo ósseo e estão associados com fraturas vertebrais e baixa densidade mineral óssea em mulheres pré-menopausadas com LES.

Uma vantagem deste estudo foi o rigoroso critério de inclusão. Foram avaliadas somente pacientes em fase de pré-menopausa já que a deficiência do estrógeno é fator de confusão para perda óssea (71,72). Essa variável não foi categorizada em estudo prévio em uma grande população onde foi associado o polimorfismo do RANKL com baixa densidade mineral óssea (19) limitando uma conclusão definitiva sobre uma possível influência adicional deste fator. Além disso, os achados que polimorfismos no gene da OPG são um fator de risco para a osteoporose (10,12) pode não ser generalizado em pacientes pré-menopausadas com LES.

Também foram excluídas pacientes que usavam medicação com ação no metabolismo ósseo, como bisfosfonatos e teriparatida, as quais são agentes antirreabsortivos e anabólicos, respectivamente, e agem no processo de remodelamento ósseo (71). Além disso, a disfunção renal foi outro critério relevante de exclusão já que pode levar a um significativo comprometimento do metabolismo ósseo (72). Complementarmente, além de analisar a densidade mineral óssea, a presença de fraturas vertebrais também foi avaliada, já que são geralmente assintomáticas e podem estar associadas com DMO normal (73,74). Uma possível limitação deste estudo foi a inclusão de estudantes da Universidade e funcionárias do Hospital no grupo controle, já que podem ser mais saudáveis e mais informadas sobre saúde e metabolismo ósseo do que a população em geral. No entanto, os dados relevantes relacionados aos

polimorfismos foram restritos aos pacientes. Outra possível limitação deste estudo, nem todas as causas de osteoporose secundárias foram avaliadas.

Este é o primeiro estudo avaliando concomitantemente polimorfismos dos genes do RANKL, da OPG, do RANK e alterações ósseas em pacientes com LES. O único estudo prévio que avaliou vários SNPs em pacientes com LES, incluindo um de RANKL e um de OPG, analisou somente a susceptibilidade genética para o LES e não a densidade óssea e outras complicações ósseas. Não foi encontrada diferença na frequência destes polimorfismos entre pacientes e controles (75), apesar dos autores não terem especificado os SNPs analisados. Neste estudo, foi confirmada a não diferença da frequência dos polimorfismos RANKL 290 A>G (rs2277438), OPG 1181 G>C (rs2073618), OPG 245 T>G (rs3134069), OPG 163 A>G (rs3102735) e RANK A>G (rs3018362) em pacientes e controles saudáveis.

Por outro lado, a frequência dos genótipos associados AG/GG do gene RANKL 290 A>G foi menor em pacientes com fratura vertebral. Outros SNPs do RANKL analisados na população geral descendente de europeus estavam associados com baixa densidade mineral óssea (19). Uma hipótese seja que a ação protetora para fraturas vertebrais do genótipo AG/GG observada neste estudo seja provavelmente consequência da ativação reduzida dos osteoclastos devido à disfunção do RANKL ou redução local desta molécula no ambiente de remodelamento ósseo. Reforçando esta hipótese, não foi encontrada associação das concentrações séricas sistêmicas de sRANKL com este polimorfismo nos pacientes com LES.

Deve-se ressaltar que o estudo encontrou uma maior frequência dos genótipos associados TG/GG da OPG 245 T>G nos pacientes lúpicos com

baixa DMO quando comparados à aqueles com densidade mineral óssea normal, confirmando estudos prévios que associavam este polimorfismo com baixa densidade mineral óssea em pacientes com osteoporose (10,12). Uma possível explicação é que o alelo G do polimorfismo da OPG 245 T>G pode induzir a disfunção da OPG com o comprometimento da densidade mineral óssea apesar de não haver alteração dos níveis séricos de OPG (49) ou os polimorfismos podem estar associados com diferentes resultados para a saúde do osso. Também foi demonstrado que o uso de glicocorticoide no momento é um fator independente para baixa densidade mineral óssea (16).

Com relação aos polimorfismos OPG 1181 G>C, OPG 163 A>G e RANK A>G, não foi encontrada neste estudo nenhuma associação com DMO ou fraturas vertebrais em mulheres pré-menopausadas com LES, apesar de esta variação genética estar associada com baixa DMO e maior risco para osteoporose em mulheres na pós-menopausa (11,18,20,49).

Com relação ao LES, a inflamação e o uso de glicocorticoides são fatores conhecidos no aumento de RANKL e redução da OPG, favorecendo a reabsorção óssea (16). Os genótipos descritos podem estar associados com proteção ou vulnerabilidade da perda de densidade mineral óssea nesta doença.

O presente trabalho demonstra que polimorfismos de RANKL e OPG parecem ter um papel importante no processo de remodelamento ósseo e estudos são necessários para confirmar seu valor como uma ferramenta adicional para avaliação de risco de perda óssea e fraturas em mulheres pré-menopausadas com LES.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra que em pacientes com LES o polimorfismo do gene RANKL 290 A>G é um fator protetor para fraturas vertebrais e polimorfismo do gene da OPG 245 T>G é um fator de risco para baixa densidade mineral óssea. Assim, este estudo fornece novos dados demonstrando que variações genéticas no sistema OPG/RANKL parecem ter um papel importante na remodelação óssea e sua principal complicação, a fratura, em pacientes com LES.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0221/10

Título: AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO DE PERDA DE MASSA ÓSSEA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

Pesquisador Executante: Luciana Parente Costa

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 03/10/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- OD.132/12 de 30/08/2012 - Inclusão de uma população de mulheres saudáveis com a finalidade de comparar com os resultados atuais do protocolo inicial;
- Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Será dissertação de mestrado da aluna Alessandra Cerezo Bonfá que terá como orientadora a Profa Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira
- Relatório Parcial

CAPPesq, 05 de Outubro de 2012

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

1. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallesse EM . Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunological Reviews* 2005;208:228–51.
2. Mok MY, Farewell VT, Isenberg DA. Risk factors for avascular necrosis of bone in patients with systemic lupus erythematosus: is there a role for antiphospholipid antibodies? *Ann Rheum Dis* 2000;59:462–67.
3. Lee C, Ramsey-Goldman R. Osteoporosis in Systemic Lupus Erythematosus Mechanisms. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:363-85.
4. Sinigaglia L, Varenna M, Girasole G, Bianchi G. Epidemiology of osteoporosis in in Rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006;32:631-58.
5. Pereira RM, Carvalho JF, Canalis E. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1197-205.
6. Regio P, Bonfá E, Takayama L, Pereira R. The influence of lean mass in trabecular and cortical bone in juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:787-92.
7. Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Zucchi F, Ghiringhelli D, Fantini F. Bone mass in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18:S27–34.
8. Bultink IEM, Lems WF, Kostense PJ, Dijkmans BAC, Voskuyl AE. Prevalence of and risk factors for low bone mineral density and vertebral fractures in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2005;54:2044–50.

9. Hofbauer and Schoppet. Osteoprotegerin. Gene Polymorphism and the Risk of Osteoporosis and Vascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4078–79.
10. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1245–55.
11. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Marc J. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G>C and 245T>G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2011;69:263-67.
12. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4080–84.
13. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
14. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21:115–37.
15. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:161-70.

- 16.Lane NE. Therapy Insight: osteoporosis and osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:562-9.
- 17.Bhalla AK. Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:313-27.
- 18.Tan W, Wu H, Zhao J, Derber LA, Lee DM, Shadick NA *et al*. A functional RANKL polymorphism associated with younger age at onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2864-75.
- 19.Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med*. 2008;358:2355-65.
- 20.Nguyen TV, Eisman JA. Genetic profiling and individualized assessment of fracture risk. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:153-61.
- 21.Cheng BH, Wang TH, Kang HY, Lin YC, Huang CC, Hsu TY, Kung FT, Huang KE. Association between single nucleotide polymorphisms of the estrogen receptor 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand genes and bone mineral density in postmenopausal Taiwanese. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2013;52:197-203.
- 22.Shang M, Lin L, Cui H. Association of genetic polymorphisms of RANK, RANKL and OPG with bone mineral density in Chinese peri- and postmenopausal women. *Clin Biochem*. 2013;15:1493-501.
- 23.Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE *et al*. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density

- loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;15;44:491-501.
24. Piedra M, García-Unzueta MT, Berja A, Paule B, Lavin BA, Valero C, Riancho JA, Amado JA. Single nucleotide polymorphism of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. *BMC Med Genet.* 2011;20:168.
25. Liu JM, Zhang MJ, Zhao L, Cui B, Li ZB, Zhao HY, Sun LH, Tao B, Li M, Ning G. Analysis of recently identified osteoporosis susceptibility genes in Han Chinese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:E112-20.
26. Roshandel D, Holliday KL, Pye SR, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Huhtaniemi IT, Adams JE, Ward KA, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Wu FC, Thomson W, O'Neill TW, EMAS Study Group. Genetic variation in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway is associated with bone turnover and bone mineral density in men. *J Bone Miner Res.* 2010;25:1830-8.
27. Takács I, Lazáry A, Kósa JP, Kiss J, Balla B, Nagy Z, Bácsi K, Speer G, Lakatos P. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. *Eur J Endocrinol.* 2010;162:423-31.
28. Mencej S, Albagha OM, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Mol Endocrinol.* 2008;40:273-9.

-
29. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007;14:913-8.
30. Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1678-95.
31. Mencej S, Prezelj J, Kocijancic A, Ostanek B, Marc J. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2006;55:219-26.
32. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, Brain JD, Rosen CJ, Laird N, Xu X. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet.* 2006;118:568-77.
33. Liu S, Yi Z, Ling M, Shi J. Association between g.19163A>G and g.23298T>C genetic variants of the osteoprotegerin gene and bone mineral density in Chinese women. *Hormones* 2013;12:578-83.
34. Guo L, Tang K, Quan Z, Zhao Z, Jiang D. Association between seven common OPG genetic polymorphisms and osteoporosis risk: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2013;33:1-11.

-
35. Yu F, Huang X, Miao J, Guo L, Tao D. Association between osteoprotegerin genetic variants and osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Endocr J*. 2013;60:1303-7.
36. Wang Q, Chen Z, Huang Y, Li Q, Zhu L, Cai X, He G, Xie Y, Liu Q. The relationship between osteoprotegerin gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Int Immunopharmacol*. 2013;17:404-7.
37. Zhu J, Luo Z, Cao Y, Yu M, Peng J, Huang D. The influence of g.19124G>a genetic polymorphism in the OPG gene on bone mineral density in Chinese women. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17:696-9.
38. Zhang F, He C, Chen G, Li F, Gao H. Association analyses of osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Med Oncol*. 2013;30:389.
39. Feng G, Meng L, Wang H, Lu Y, Jia J, Zhang Y, Zhang H, Zhang B. Single-nucleotide polymorphism of the osteoprotegerin gene and its association with bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25:1141-4.
40. Vidal C, Formosa R, Xuereb-Anastasi A. Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *J Mol Endocrinol*. 2011;47:327-3.
41. Celczynska Bajew L, Horst Sikorska W, Bychowiec B, Wykretowicz A, Wesoty J, Michalak M. The effects of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in patients with ischaemic heart disease on the morphology of coronary arteries and bone mineral density. *Kardiol Pol*. 2011;69:573-8.

-
42. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Marc J. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G>C and 245T>G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2011;69:263-7.
43. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, Bianchi EN, Grundberg E, Liang L, Richards JB, Estrada K, Zhou Y, van Nas A, Moffatt MF, Zhai G, Hofman A, van Meurs JB, Pols HA, Price RI, Nilsson O, Pastinen T, Cupples LA, Lusi AJ, Schadt EE, Ferrari S, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Spector TD, Karasik D, Kiel DP. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility Loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet.* 2010;6(6):e1000977.
44. Eun IS, Park WW, Suh KT, Kim JI, Lee JS. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2009;18:1936-40.
45. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2010;37:227-34.
46. Jurado S, Nogués X, Agueda L, Garcia-Giralt N, Urreizti R, Yoskovitz G, Pérez-Edo L, Saló G, Carreras R, Mellibovsky L, Balcells S, Grinberg D, Díez-Pérez A. Polymorphisms and haplotypes across the osteoprotegerin gene associated with bone mineral density and osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2010;21:287-96.
47. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Teskac K, Ostanek B, Smelcer M, Marc J. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11

- genes are associated with bone mineral density. *J Mol Endocrinol.* 2009;42:239-47.
48. García-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, Sañudo C, Berja A, Valero C, Pesquera C, Paule B, González-Macías J, Amado JA. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res.* 2008;40:219-24.
49. Ueland T, Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Mullin BH, Devine A, Prince RL. No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone* 2007;40:175–181.
50. Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2006;53:386-95.
51. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, Brain JD, Rosen CJ, Laird N, Xu X. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet.* 2006;118:568-77.
52. Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Shin CS, Kim H, Lee KM, Lee KH, Kang C, Cho DY, Kang D. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005;77:152-9.
53. Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005;51:270-9.

-
54. Jørgensen HL, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen JB. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:132-8.
55. Brändström H, Gerdhem P, Stiger F, Obrant KJ, Melhus H, Ljunggren O, Kindmark A, Akesson K. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:18-24.
56. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002;47:400-6.
57. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int.* 2002;71:26-35.
58. İşleten B, Durmaz B, Durmaz B, Onay H, Ozkınay F, Durmaz A, Turan V, Oztekin K. The association of RANK gene C421T and C575T polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Turkish women. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;288:917-23.
59. Zupan J, Mencej-Bedrac S, Jurković-Mlakar S, Prezelj J, Marc J. Gene-gene interactions in RANK/RANKL/OPG system influence bone mineral density in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118:102-6.

-
60. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Snorradottir S, Center JR, Nguyen TV, Alexandersen P, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet.* 2009;41:15-7.
61. Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007;18:323-31.
62. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
63. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, Hanly JG, Isenberg DA, Petri M, Nived O, Snaith M, Sturfelt G. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol.* 2000;27:373-6.
64. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, Kalkwarf HJ, Langman CB, Plotkin H, Rauch F, Zemel BS, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Silverman S. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 2008;43:1115-21.

-
65. Obrant KJ, Bengtér U, Johnell O, Nilsson BE, Sernbo I. Increasing age-adjusted risk of fragility fractures: a sign of increasing osteoporosis in successive generations? *Calcif Tissue Int.* 1989;44:157-67.
66. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 1993;8:1137-48.
67. Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, Kuroishi ME, Takayama L, Caparbo VF *et al.* Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:809-15.
68. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
69. Kirkwood BR & Sterne JAC. *Essential medical statistics.* 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006;502.
70. Hosmer DW, & Lemeshow S. *Applied Logistic Regression.* 2a. ed. New York: Wiley. 2000;320.
71. Yeap SS, Fauzi AR, Kong NC, Halim AG, Soehardy Z, Rahimah S, Chow SK, Goh EM. Influences on bone mineral density in Malaysian premenopausal systemic lupus erythematosus patients on corticosteroids. *Lupus* 2009;18:178-81.
72. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, Deal C, Caplan L, Chen W, Curtis JR, Furts DE, McMahon M, Patkar NM, Volkmann E, Saag KG. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the

- prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Research* (Hoboken) 2010;62:1515–26.
- 73.Chugh PK. Management of women with systemic lupus erythematosus. *Maturitas* 2013;75:207-14.
- 74.Lopes JB, Fung LK, Cha CC, Gabriel GM, Takayama L, Figueiredo CP, Pereira RM. The impact of asymptomatic vertebral fractures on quality of life in older community-dwelling women: the São Paulo Ageing & Health Study. *Clinics* (Sao Paulo). 2012;67:1401-6.
- 75.Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y, Nakamura T, Lee JH, Tsai CY, Chiang BL, Shimoda T, Harada M, Tahira T, Hayashi K, Horiuchi T. Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008;47:158-64.

O presente trabalho foi apresentado no XXX Congresso Brasileiro de Reumatologia na Sessão Pôster Tour.

O presente trabalho foi apresentado no XX Encontro de Reumatologia Avançada como Comunicação Oral.

CERTIFICADO

Certificamos que o Trabalho nº CO.02-"POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO EM GENES DO SISTEMA OPG/RANKL EM MULHERES COM LUPUS NA PRÉ-MENOPAUSA: ASSOCIAÇÃO COM MASSA ÓSSEA E FRATURAS VERTEBRAIS" de autoria de *Bonfá AC, Seguro LPC, Caparbo V, Bonfá E, Pereira RMR* foi apresentado como Comunicação Oral no XX Encontro de Reumatologia Avançada, realizado de 27 a 29 de março de 2014 em São Paulo, SP.

Dawton Y. Torigoe
Presidente SPR

Simone Appenzeller
Diretora Científica

RANKL and OPG gene polymorphisms: association with vertebral fractures and bone mineral density in premenopausal systemic lupus erythematosus

Alessandra C Bonfá, Luciana PC Seguro, Valéria Caparbo, Eloísa Bonfá and Rosa MR Pereira

Alessandra C Bonfá

Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Luciana PC Seguro

Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Valéria Caparbo

Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Eloísa Bonfá

Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Rosa MR Pereira

Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Corresponding Author

Rosa MR Pereira, Rheumatology Division, Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, 3 andar, Sala 3105, São Paulo, Brazil

Email: rosamariarp@yahoo.com

Abstract

Objective. To evaluate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), RANK and osteoprotegerin (OPG) genes in premenopausal systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their association with sRANKL and OPG serum levels, vertebral fractures and bone mineral density(BMD).

Methods. 211 premenopausal SLE patients (ACR criteria) and 154 healthy controls were enrolled. SNPs of RANKL 290A>G(rs2277438), OPG 1181G>C(rs2073618), 245T>G(rs3134069), 163 A>G(rs3102735) and RANK A>G(rs3018362) were obtained by real-time PCR. sRANKL/OPG serum levels were determined by ELISA. BMD and vertebral fractures were evaluated by dual energy X-ray absorptiometry.

Results. SLE patients and controls had similar frequencies of the RANKL 290 G allele ($p=0.94$), OPG 1181 C allele ($p=0.85$), OPG 245 G allele ($p=0.85$), OPG 163 G allele ($p=0.78$) and RANK G allele ($p=0.87$). Further analysis of SLE patients revealed that the frequency of the RANKL 290 G allele was lower in patients with fractures than in patients without fractures (28.1 vs. 46.9%, $p=0.01$). In addition, the frequency of the OPG 245 G allele was higher in patients with low BMD than in patients with normal BMD (31.4 vs. 18.1%, $p=0.04$). No association of OPG 1181 G>C, OPG 163 A>G and RANK A>G SNPs with BMD/fractures was found. Additionally, no association was observed between RANKL/OPG/RANK SNPs and sRANKL/OPG serum levels.

Conclusions. Our study provides novel data demonstrating that RANKL/OPG genetic variations seems to play a role in bone remodeling and, particularly, in its major complication, fracture, in premenopausal patients with SLE.

Keywords SLE, premenopausal, RANKL, OPG, RANK, polymorphism, BMD, fracture

Introduction

The improvement of the survival rate in systemic lupus erythematosus (SLE) has been accompanied by an increase in the incidence of long-term complications such as osteoporosis and fractures^{1,2}. These bone complications may result from several mechanisms, including disease-related factors, therapy and genetic susceptibility^{2,3,4}.

In fact, bone mineral density (BMD) is reduced in SLE patients when compared to healthy subjects. Up to 22% of premenopausal SLE women have low bone mass⁵, and 20% have vertebral fractures⁶.

The structural integrity and quality of the skeletal system are maintained by the bone remodeling process, which involves bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts^{8,9}. The discovery of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), its ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) has led to a better understanding of the regulation of this process¹⁰. RANKL binds to RANK, activates osteoclasts and promotes bone resorption; this interaction is inhibited by OPG^{8,11}.

In SLE, inflammation and therapy with glucocorticoids can increase osteoclast maturation and reduce osteoblast differentiation, leading to rapid bone loss¹². These factors also induce an increase in RANKL expression and a decrease in OPG expression in stromal and osteoblastic cells, with a consequent increase in bone resorption^{12,13}.

In addition, polymorphisms in the RANKL, OPG and RANK genes can affect the transcription of these genes and, thus, expression of the encoded proteins^{7,17} in addition to altering the RANKL/OPG ratio and compromising the bone remodeling process, resulting in bone mass changes and an increased

risk of fractures⁷. In fact, RANKL and RANK gene polymorphisms are associated with low BMD¹⁴ and higher fracture risk¹⁷ in the general population, and OPG gene polymorphisms have been considered a risk factor for genetic susceptibility for postmenopausal osteoporosis^{7,15}. There are, however, no data regarding the possible influence of RANKL, OPG and RANK polymorphisms in bone complications in SLE patients.

The RANKL 290 A>G; OPG 1181 G>C, 245 T>G, and 163 A>G; and RANK A>G gene SNPs were chosen because they are the SNPs most frequently associated with decreased bone mineral density and increased fractures in the literature^{9,15-17}.

Thus, the aim of the present study was to concomitantly evaluate SNPs in the RANKL, OPG and RANK genes in premenopausal SLE patients and the association between these SNPs and the soluble RANKL (sRANKL) and OPG serum levels, vertebral fractures and bone mineral density.

Patients and methods

Two hundred and eleven premenopausal patients were enrolled from our Lupus Outpatient Clinic at *Hospital das Clínicas*, University of São Paulo, Brazil. This hospital is the largest public tertiary referral center in Latin America, and the Rheumatology Outpatient Clinic treats approximately 15,000 patients/year.

We included consecutive patients from January 2011 to January 2012 who fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) criteria for a diagnosis of SLE¹⁸. All patients were premenopausal, confirmed by the presence of regular menstrual cycles or the levels of gonadotropins. Exclusion criteria were

menopause, secondary amenorrhea, history of thyroid disorders, creatinine clearance <60 mL/min, use of bone active drugs (bisphosphonates and teriparatide), pregnancy and clinical symptoms of gastrointestinal malabsorption (chronic diarrhea, bulky stools, bloating, cramping and gas). Only 5% (n=11) of the patients refused to participate.

Disease activity and damage were assessed by the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)¹⁹ and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (SDI)²⁰, respectively. Data were obtained from an ongoing electronic database protocol that was carried out for all patients at 1- to 6-month intervals and consisted of an extensive clinical and laboratory evaluation including disease activity and previous and current glucocorticoid use during the last nine years in the Lupus Outpatient Clinic.

A total of 154 healthy women, who were staff members at the Hospital or students from University of São Paulo, were enrolled as controls. At entry, volunteers of the control group underwent a screening to analyze BMD and vertebral fracture assessment (VFA) by dual energy X-ray absorptiometry (DXA), and those with low BMD for their chronological age ($Z\text{-score} \leq -2.0$)²¹ or any grade of deformity by vertebral fracture assessment or history of fragility fracture (defined as a fracture of a rib, forearm, humerus or femur at an adult age that occurred during ordinary activities, such as a fall from standing height or less)²² were excluded. Additional exclusion criteria were pregnancy; menopause; history of chronic diseases, including thyroid disorders; diabetes; kidney or hepatic insufficiency and the use of bone active drugs (bisphosphonates and teriparatide).

Anthropometric data including age, weight and height were measured in both groups. The age of menarche, personal and parental history of fracture, current tobacco use, alcohol consumption (considered significant if ≥ 3 units/day), dietary calcium intake and physical activity frequency and intensity (at least 3 times a week for over last 6 months) were assessed by a standardized questionnaire during the study interview¹².

sRANKL and OPG and serum levels

Serum levels for determination of sRANKL and OPG were collected from patients and controls under fasting conditions and stored at -80°C for later measurement. sRANKL (ampli-sRANKL, ELISA; Biomedica, Vienna, Austria) and OPG (Osteoprotegerin, ELISA; Biomedica, Vienna, Austria) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions. The inter-assay and intra-assay CV for sRANKL were 3.9% and 1.3%, and for OPG, they were 6.2% and 1.1%, respectively. Samples from 178 patients and 124 controls were consecutively selected to be tested, and all tests were performed in duplicate. The detection limit established by the manufacturer for sRANKL was (0 pmol/l +3 SD) 0.02 pmol/l, and for OPG, was (0 pmol/l +3 SD) 0.14 pmol/l. In 46.6% of patients and 50.8% of healthy controls, sRANKL serum levels were undetectable. OPG serum levels were detected in all patients and controls.

Bone Mineral Density (BMD)

BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) using Hologic densitometry equipment (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, USA) at the

lumbar spine (L1-L4), total hip and femoral neck, using the same equipment in all patients and controls. Anatomically abnormal vertebrae were excluded from analysis according to International Society for Clinical Densitometry (ISCD) recommendations²¹. Low BMD for chronological age was defined as a Z-score ≤ -2.0 , and normal BMD for chronological age was defined as a Z-score > -2.0 ²¹. Coefficients of variation for BMD were 0.7% for the lumbar spine (L1–L4), 1.2% for the total hip and 1.5% for the femoral neck.

Body composition, including lean mass, fat mass, fat percentage and bone mineral content were measured by DXA, using the same densitometry equipment (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, USA).

Vertebral fracture assessment (VFA)

Images of the thoracic and lumbar spine were obtained by DXA using the same densitometry equipment (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, USA) and performed by two rheumatologists (LPCS, RMRP) who had experience in this area and who were trained according to ISCD vertebral fracture assessment protocols²¹. Agreements between the readers were high, with an interobserver kappa coefficient of 0.78. A consensus was reached between the readers for any difference of interpretation. VFA was classified using the Genant semiquantitative (SQ) approach, where mild (grade 1) is a reduction of 20–25% of the anterior, middle, and/or posterior height; moderate (grade 2), a reduction of 26–40% in any height; and severe (grade 3), a reduction of over 40% in any height^{23,24}.

SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral-blood leucocytes using EDTA as anticoagulant. DNA was obtained by the *salting out* technique²⁵ and stored at -70°C until analyzed. Genotyping was performed with custom Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) using allele discrimination in real-time polymerase chain reaction (PCR) equipment StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA). Products were amplified in a 10 μl reaction, and cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 seconds and annealing for 1 minute at 60°C .

SNPs of RANKL gene (chromosomal location 13q14) 290 A>G (rs2277438), OPG gene (8q24) [1181 G>C (rs2073618), 245T>G (rs3134069), 163 A>G (rs3102735)] and RANK gene (18p21) A>G (rs3018362) were analyzed in all participants. To check the quality of the genotyping, 30 random samples (8.2%) were analyzed twice¹⁶, and results showed a 98% concordance. Discordant samples were analyzed three times and concordant results were presented.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean and standard deviation or percentage. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normal distribution of variables²⁶. Patients and controls were compared using Student's t, Mann-Whitney, chi-square and Fisher's exact tests. Patients were divided according to the presence or absence of vertebral fractures and low BMD and compared using Student's t, Mann-Whitney, chi-square and Fisher's exact tests. Multiple logistic regression models were used to analyze which factors were independently associated with vertebral fractures and with low BMD including

all variables with $p < 0.10$ in the bivariate analysis in each model. Hosmer and Lemeshow²⁷ test was used to verify goodness of fit of logistic regression model.

The Hardy-Weinberg equilibrium was assessed in patients and controls by comparing the observed SNP distribution with the expected distribution using the chi-squared test.

The software used was SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

The statistical power was 71% (CI95%), based on the sample size and number of patients. As this study comprises a convenience sample, the power calculation refers to the difference observed in the frequency of RANKL 290 A>G SNP and the presence of vertebral fractures, which is the primary endpoint.

Ethics Committee Approval

The study was approved by the Research and Ethics Committee of *Hospital das Clínicas*, and all participants read and signed the informed consent.

Results

Patients vs. controls

Demographic and anthropometric characteristics, bone mineral density, body composition parameters, risk factors for osteoporosis and sRANKL/OPG serum levels of SLE patients and controls are shown in Table 1.

Patients had a mean age at disease onset of 25.9 ± 7.0 years, a disease duration of 7.5 ± 6.1 years, SDI of 0.66 ± 0.85 and SLEDAI in the year before the study of 1.9 ± 2.1 . At the time of the study, 75.4% of patients were taking

prednisone, with a mean dose of 14.4 ± 15.7 mg/day. Regarding previous glucocorticoid use, the maximum prednisone dose was 44.3 ± 20.9 mg, the mean dose was 17.5 ± 15.7 mg/day and the cumulative dose was 28.6 ± 22.1 g.

Serum levels of sRANKL and OPG were measured in 178 patients and 124 controls and were similar in both groups (Table 1).

Polymorphisms analysis

The observed allelic frequency distributions of the study population (n=365) were in Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphisms analyzed: RANKL 290 A>G ($X^2= 1.06$; $p= 0.30$), OPG 1181 G>C ($X^2= 3.19$; $p= 0.07$), OPG 245 T>G ($X^2= 0.80$; $p= 0.37$), OPG 163 A>G ($X^2= 0.04$; $p= 0.84$) and RANK A>G ($X^2= 1.5$; $p= 0.22$).

RANKL, OPG and RANK SNPs genotype frequencies were similar in patients and controls for all five SNPs (Table 2). The distribution of SNP genotypes for patients was as follows: RANKL 290 A>G AA:AG:GG = 124:74:13, OPG 1181 G>C GG:GC:CC = 79:97:35, OPG 245 T>G TT:TG:GG = 166:44:1, OPG 163 A>G AA:AG:GG = 8:66:137 and RANKL A>G AA:AG:GG = 25:86:100; and for the control group: RANKL 290 A>G AA:AG:GG = 92:60:2, OPG 1181 G>C GG:GC:CC = 60:62:32, OPG 245 T>G TT:TG:GG = 119:33:2, OPG 163 A>G AA:AG:GG = 5:49:100 and RANKL A>G AA:AG:GG = 20:65:69.

Patients with vertebral fractures vs. patients without vertebral fractures

Sixty four (30.3%) patients had at least one mild (grade 1) vertebral fracture. With respect to the number of vertebral fractures, 35 (54.7%) patients

had one, 21 (32.8%) patients had two, six (9.4%) patients had three, one (1.6%) patient had four and one patient (1.6%) had five vertebral fractures. The locations of vertebral fractures were as follows: L4 in 22 (34.4%) patients, L3 in 29 (45.3%) patients, L2 in 14 (21.9%) patients, L1 in 11 (17.2%) patients, T12 in ten (15.6%) patients, T11 in nine (14.1%) patients, T10 in five (7.8%) patients, T9 in four (6.3%) patients and T6 in one (1.6%) patient. The frequency of the RANKL 290 G allele (AG/GG) was lower in patients with vertebral fractures than in patients without vertebral fractures ($p=0.011$). There was no difference in the frequency of the other four SNPs in the groups arrayed according to the presence of vertebral fractures (Table 3).

Demographic and anthropometric characteristics, SLEDAI and SDI scores, data on glucocorticoid use, BMD and body composition parameters, risk factors for osteoporosis, use of chloroquine, 25OHD serum levels and the frequency of RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G and RANK A>G SNPs in SLE patients with and without vertebral fractures are shown in Table 4. A logistic regression fitted model for the presence of vertebral fractures in SLE patients is shown in Table 5.

Patients with low BMD for chronological age vs. patients with normal BMD for chronological age

Fifty one (24.2%) patients had low BMD for their chronological age in the lumbar spine and/or hip. The frequency of the OPG 245 G allele (TG/GG) was higher in patients with low BMD than in patients with normal BMD ($p=0.044$). There was no difference in the frequency of the other four SNPs in the groups arrayed according to BMD (Table 6).

Demographic and anthropometric characteristics, SLEDAI and SDI scores, data on glucocorticoid use, BMD and body composition parameters, risk factors for osteoporosis, use of chloroquine, 25OHD serum levels and the frequency of RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G and RANK A>G SNPs in SLE patients with normal BMD (Z-score > -2.0) and low BMD (Z-score $\leq$ -2.0) are shown in Table 7. A logistic regression fitted model for low BMD for chronological age (Z-score $\leq$ -2.0) in SLE patients is shown in Table 8.

Discussion

The present study demonstrated that RANKL and OPG gene polymorphisms influence bone metabolism and are associated with vertebral fractures and low bone mineral density in premenopausal women with SLE.

An advantage of our study is the strict inclusion criteria. We assessed only premenopausal patients because estrogen deficiency is an important confounding factor for bone loss^{28,29}. This variable was not categorized in a previous large population study of the association of RANKL gene polymorphism with low BMD¹⁴, precluding a definitive conclusion about the possible additional influence of this factor. Furthermore, the finding that OPG gene polymorphisms are a risk factor for postmenopausal osteoporosis^{7,15} may not be generalizable for premenopausal SLE patients.

We also excluded patients who used bone-active drugs, such as bisphosphonates and teriparatide, which are anti-resorptive and anabolic agents, respectively, and act on the bone remodeling process²⁸. Moreover, renal dysfunction was a relevant exclusion criterion because it can lead to

significant impairment of bone metabolism²⁹. In addition to assessing BMD, we also evaluated the presence of vertebral fractures, which are usually asymptomatic and can be associated with normal BMD^{30,31}. A possible limitation of the present study is the fact that hospital staff members and students comprise a control group that could be healthier and more aware of bone health issues than the general population; however, the relevant findings regarding polymorphisms were restricted to the patients. In addition, another limitation of this study is that not all causes of secondary osteoporosis were evaluated.

This is the first study that concomitantly assesses RANKL, OPG and RANK gene polymorphisms and bone in SLE patients. The only previous study that assessed several SNPs in SLE patients, including one OPG and one RANKL SNP, analyzed only the genetic susceptibility for SLE and not BMD or other bone complications. In this earlier study, no difference was found in the frequency of these polymorphisms between patients and controls³², although the authors did not specify the SNPs assessed. In the present study, we confirmed this observation for RANKL 290 A>G (rs2277438), OPG 1181 G>C (rs2073618), OPG 245 T>G (rs3134069), OPG 163 A>G (rs3102735) and RANK A>G (rs3018362).

In contrast, the frequency of the G allele of RANKL 290 A>G was lower in patients with vertebral fractures. Other RANKL SNPs assessed in the general European-descendent population have been associated with low BMD¹⁴. We hypothesized that the protection against vertebral fractures that is associated with the AG/GG genotype observed in the present study is most likely a consequence of decreased osteoclast activation due to a dysfunction of RANKL

or a local reduction of this molecule in bone. Supporting this notion, no evidence for a reduction in sRANKL systemic serum levels associated with this polymorphism was observed in SLE patients.

Of note, a higher frequency of the G allele of OPG 245 T>G in SLE patients with low BMD compared to those with normal BMD confirms previous studies that associated this polymorphism with low BMD in patients with osteoporosis^{7,15}. A possible explanation is that the G allele of the OPG 245 T>G polymorphism could induce a dysfunction of OPG with a deleterious effect on BMD in spite of normal OPG serum concentrations³³ or the polymorphisms could be associated with different bone health outcomes. We further demonstrated that current glucocorticoid use is also an independent factor for low bone mineral density in SLE¹¹.

With regards to the OPG 1181 G>C, OPG 163 A>G and RANK A>G polymorphisms, the present study did not find any association with BMD or vertebral fractures in premenopausal SLE, in spite of the fact that these genetic variations have been associated with low BMD and higher risk for osteoporosis in postmenopausal women^{9,13,17,34}.

Concerning to SLE, inflammation and glucocorticoid are known factors that increase RANKL and reduce OPG levels, favoring bone resorption¹¹. The described genotypes might be associated with bone-loss protection or vulnerability in this disease.

In conclusion, the present work demonstrates that OPG and RANKL polymorphisms appear to play an important role in the bone remodeling process, and further studies are necessary to confirm the value of SNP

screening as an additional tool for risk assessment for bone loss and fractures in premenopausal women with SLE.

References

1. Lee C, Ramsey-Goldman R. Osteoporosis in Systemic Lupus Erythematosus Mechanisms. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:363-85.
2. Sinigaglia L, Varenna M, Girasole G, Bianchi G. Epidemiology of osteoporosis in in Rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2006;32:631-58.
3. Pereira RM, Carvalho JF, Canalis E. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1197-205.
4. Regio P, Bonfá E, Takayama L, Pereira R. The influence of lean mass in trabecular and cortical bone in juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:787-92.
5. Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Zucchi F, Ghiringhelli D, Fantini F. Bone mass in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:S27–34.
6. Bultink IEM, Lems WF, Kostense PJ, Dijkmans BAC, Voskuyl AE. Prevalence of and risk factors for low bone mineral density and vertebral fractures in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2005;54:2044–2050.
7. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4080–4084.

8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
9. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Marc J. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G>C and 245T>G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2011;69:263-267.
10. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:161-70.
11. Lane NE. Therapy Insight: osteoporosis and osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:562-9.
12. Bhalla AK. Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:313-27.
13. Tan W, Wu H, Zhao J, Derber LA, Lee DM, Shadick NA *et al.* A functional RANKL polymorphism associated with younger age at onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2864-75.
14. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T *et al.* Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008;358:2355–65.
15. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2002;17:1245–1255.
16. Piedra M, García-Unzueta MT, Berja A, Paule B, Lavin BA, Valero C, Riancho JA, Amado JA. Single nucleotide polymorphism of the

- OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. *BMC Med Genet*. 2011;20:168.
17. Nguyen TV, Eisman JA. Genetic profiling and individualized assessment of fracture risk. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:153-61.
18. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
19. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
20. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Fortin P, Ginzler E *et al*. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol* 2000;27:373-6.
21. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML *et al*. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 2008;43:1115-21.
22. Obrant KJ, Bengtner U, Johnell O, Nilsson BE, Sernbo I. Increasing age-adjusted risk of fragility fractures: a sign of increasing osteoporosis in successive generations? *Calcif Tissue Int*. 1989;44:157-67.
23. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 1993;8:1137-48.

24. Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, Kuroishi ME, Takayama L, Caparbo VF *et al.* Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:809-15.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
26. Kirkwood BR & Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006;502.
27. Hosmer DW, & Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. 2a. ed. New York: Wiley. 2000;320.
28. Yeap SS, Fauzi AR, Kong NC, Halim AG, Soehardy Z, Rahimah S *et al.* Influences on bone mineral density in Malaysian premenopausal systemic lupus erythematosus patients on corticosteroids. *Lupus* 2009;18:178-81.
29. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, Deal C, Caplan L, Chen W *et al.* American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Research (Hoboken)* 2010;62:1515–26.
30. Chugh PK. Management of women with systemic lupus erythematosus. *Maturitas* 2013;75:207-14.
31. Lopes JB, Fung LK, Cha CC, Gabriel GM, Takayama L, Figueiredo CP, Pereira RM. The impact of asymptomatic vertebral fractures on quality of

- life in older community-dwelling women: the São Paulo Ageing & Health Study. *Clinics* (Sao Paulo). 2012;67:1401-6.
- 32.Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y *et al.* Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008;47:158-64.
- 33.Ueland T, Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Mullin BH *et al.* No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone* 2007;40:175–181.
- 34.Jørgensen HL, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen JB. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:132-8.

Table 1. Demographic and anthropometric characteristics, bone mineral density, body composition parameters, risk factors for osteoporosis and sRANKL/OPG serum levels of SLE patients and controls

	SLE patients (n = 211)	Controls (n = 154)	<i>P</i>
Age, years	33.3 ± 7.3	32.1 ± 7.2	0.114
Weight, kg	68.4 ± 14.2	65.9 ± 14.7	0.098
Height, m	1.59 ± 0.06	1.61 ± 0.06	0.001
Lumbar spine BMD, g/cm ²	0.955 ± 0.122	1.007 ± 0.096	<0.001
Femoral neck BMD, g/cm ²	0.791 ± 0.126	0.817 ± 0.116	0.039
Total hip BMD, g/cm ²	0.883 ± 0.119	0.925 ± 0.111	0.001
Bone mineral content, kg	2.01 ± 0.28	2.06 ± 0.28	0.074
Fat mass, kg	24.86 ± 9.18	22.50 ± 9.05	0.016
Lean mass, kg	41.58 ± 6.21	41.05 ± 6.40	0.426
Fat percentage, %	35.3 ± 6.5	33.5 ± 6.1	0.006
Age of menarche, years	12.8 ± 1.6	12.5 ± 1.4	0.023
Parental history of fracture, n (%)	38 (18.0)	8 (5.2)	<0.001
Parental history of OP, n (%)	31 (14.7)	17 (11.0)	0.349
Personal history of fracture, n (%)	29 (13.7)	11 (7.1)	0.061
Tobacco use, n (%)	19 (9.0)	13 (8.4)	1.000
Calcium intake, mg/day	660.3 ± 505.1	409.4 ± 201.4	<0.001
Calcium supplementation, n (%)	57 (27.0)	0	<0.001
Regular physical exercise, n (%)	51 (24.2)	72 (46.8)	<0.001
sRANKL, pmol/L, n= 178/124	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.781
OPG, pmol/L, n= 178/124	5.1 ± 3.1	4.6 ± 2.1	0.100
sRANKL/OPG, n= 178/124	0.059 ± 0.141	0.062 ± 0.152	0.888

Data are shown as mean±SD or number (percentage)

BMD: bone mineral density; OP: osteoporosis; sRANKL: soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin

Table 2. RANKL, OPG and RANK SNPs genotype frequencies of SLE patients and controls

	Genotype	SLE patients (n = 211)	Controls (n = 154)	<i>P</i>
RANKL 290 A>G	AA	124 (58.8)	92 (59.7)	0.937
	AG/GG	87 (41.2)	62 (40.3)	
OPG 1181 G>C	GG	79 (37.4)	60 (39.0)	0.852
	GC/CC	132 (62.6)	94 (61.0)	
OPG 245 T>G	TT	166 (78.7)	119 (77.3)	0.848
	TG/GG	45 (21.3)	35 (22.7)	
OPG 163 A>G	AA	8 (3.8)	5 (3.2)	0.782
	AG/GG	203 (96.2)	149 (96.8)	
RANK A>G	AA	25 (11.8)	20 (13.0)	0.869
	AG/GG	186 (88.2)	134 (87.0)	

Data are shown as number (percentage)

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin; RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B

Table 3. RANKL, OPG and RANK SNPs genotype frequencies of SLE patients with and without vertebral fractures

	Genotype	SLE patients With vertebral fracture (n = 64)	SLE patients Without vertebral fracture (n = 147)	<i>P</i>
RANKL 290 A>G	AA	46 (71.9)	78 (53.1)	0.011
	AG/GG	18 (28.1)	69 (46.9)	
OPG 1181 G>C	GG	23 (35.9)	56 (38.1)	0.886
	GC/CC	41 (64.1)	91 (61.9)	
OPG 245 T>G	TT	48 (75.0)	118 (80.3)	0.390
	TG/GG	16 (25.0)	29 (19.7)	
OPG 163 A>G	AA	0 (0.0)	8 (5.4)	0.109
	AG/GG	64 (100.0)	139 (94.6)	
RANK A>G	AA	7 (10.9)	18 (12.2)	0.787
	AG/GG	57 (89.1)	129 (87.8)	

Data are shown as number (percentage)

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B

Table 4. Demographic and anthropometric characteristics, SLEDAI and SDI scores, data on glucocorticoid use, BMD and body composition parameters, risk factors for osteoporosis, use of chloroquine, 25OHD serum levels and presence of polymorphisms (RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G and RANK A>G) in SLE patients with and without vertebral fractures

Variable	Vertebral fracture		Total (n = 211)	P
	With (n = 64)	Without (n = 147)		
Age, years	35.6 ± 7.3	32.3 ± 7.0	33.3 ± 7.3	0.002
Disease duration, years	7.6 ± 5.2	7.5 ± 6.5	7.6 ± 6.1	0.939
BMI, kg/m ²	27.1 ± 4.8	27.0 ± 5.4	27.0 ± 5.2	0.918
Cumulative* SLEDAI (mean)	2.5 ± 1.7	2.4 ± 2.2	2.4 ± 2.1	0.726
SDI	0.7 ± 1.1	0.6 ± 0.7	0.7 ± 0.9	0.534
Current GC use, n (%)	45 (70.3)	114 (77.6)	159 (75.4)	0.262
Current GC dose, mg	12.2 ± 14.7	15.4 ± 16.0	14.4 ± 15.7	0.175
Previous* maximum GC dose, mg	44.9 ± 21.0	44.0 ± 20.9	44.3 ± 20.9	0.759
Previous* mean GC dose, mg	15.0 ± 13.3	18.7 ± 16.6	17.5 ± 15.7	0.089
Cumulative* GC dose, g	28.8 ± 20.8	28.5 ± 22.7	28.6 ± 22.1	0.926
Lumbar spine BMD, g/cm ²	0.955 ± 0.114	0.955 ± 0.125	0.955 ± 0.122	0.992
Femoral neck BMD, g/cm ²	0.810 ± 0.144	0.780 ± 0.117	0.790 ± 0.126	0.217
Total hip BMD, g/cm ²	0.890 ± 0.119	0.880 ± 0.118	0.880 ± 0.119	0.456
Bone mineral content, kg	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	0.748
Fat mass, kg	24.5 ± 8.9	25.0 ± 9.3	24.9 ± 9.2	0.735
Lean mass, kg	41.7 ± 5.8	41.5 ± 6.4	41.6 ± 6.2	0.801
Fat percentage, %	35.0 ± 6.9	35.5 ± 6.3	35.3 ± 6.5	0.623
Age of menarche, years	12.8 ± 1.6	12.9 ± 1.6	12.8 ± 1.6	0.802
Parental history of fracture, n (%)	9 (14.1)	29 (19.7)	38 (18.0)	0.325
Parental history of OP, n (%)	11 (17.2)	20 (13.6)	31 (14.7)	0.499
Personal history of fracture, n (%)	9 (14.1)	20 (13.6)	29 (13.7)	0.929
Tobacco use, n (%)	6 (9.4)	13 (8.8)	19 (9.0)	0.901
Calcium intake, mg/day	714.6 ± 519.9	636.7 ± 498.5	660.3 ± 505.1	0.305
Calcium supplementation, n (%)	20 (31.2)	37 (25.2)	57 (27.0)	0.361
Regular physical exercise, n (%)	14 (21.9)	37 (25.2)	51 (24.2)	0.607
Chloroquine use, n(%)	52 (81.2)	103 (70.1)	155 (73.5)	0.091
25OHD serum levels, ng/ml	25.1 ± 8.4	24.4 ± 9.1	24.6 ± 8.9	0.580
25OHD < 30 ng/ml	48 (75.0)	106 (72.1)	154 (73.0)	0.737
25OHD < 20 ng/ml	17 (26.6)	48 (32.7)	65 (30.8)	0.420
25OHD < 10 ng/ml	1 (1.6)	3 (2.0)	4 (1.9)	1.000
RANKL 290 A>G	18 (28.1)	69 (46.9)	87 (41.2)	0.011
OPG 1181 G>C	41 (64.1)	91 (61.9)	132 (62.6)	0.886
OPG 245 T>G	16 (25.0)	29 (19.7)	45 (21.3)	0.390
OPG 163 A>G	64 (100.0)	139 (94.6)	203 (96.2)	0.109
RANK A>G	57 (89.1)	129 (87.8)	186 (88.2)	0.787

Data are shown as mean±SD or number (percentage)

*Last 9 years; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; GC: glucocorticoid; BMD: bone mineral density; OP: osteoporosis; 25OHD: 25-hydroxyvitamin D ; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin; RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B.

Table 5. Multiple logistic regression analyses for the presence of vertebral fractures in SLE patients

Variable	OR	CI (95%)	<i>P</i>
Age, years	1.07	1.021 - 1.112	0.004
RANKL 290 A>G	0.45	0.235 - 0.860	0.016

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

Table 6. RANKL, OPG and RANK SNPs genotype frequencies of SLE patients with low bone mineral density (Z-score $\leq$ -2.0) and normal bone mineral density (Z-score $>$ -2.0)

	Genotype	SLE patients Z-score $\leq$ -2.0 (n = 51)	SLE patients Z-score $>$ -2.0 (n = 160)	<i>P</i>
RANKL 290 A>G	AA	32 (62.7)	92 (57.5)	0.508
	AG/GG	19 (37.3)	68 (42.5)	
OPG 1181 G>C	GG	22 (43.1)	57 (35.6)	0.424
	GC/CC	29 (56.9)	103 (64.4)	
OPG 245 T>G	TT	35 (68.6)	131 (81.9)	0.044
	TG/GG	16 (31.4)	29 (18.1)	
OPG 163 A>G	AA	3 (5.9)	5 (3.1)	0.404
	AG/GG	48 (94.1)	155 (96.9)	
RANK A>G	AA	7 (13.7)	18 (11.3)	0.634
	AG/GG	44 (86.3)	142 (88.8)	

Data are shown as number (percentage)

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin; RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B

Table 7. Demographic and anthropometric characteristics, SLEDAI and SDI scores, data on glucocorticoid use, BMD and body composition parameters, risk factors for osteoporosis, use of chloroquine, 25OHD serum levels and presence of polymorphisms (RANKL 290 A>G, OPG 1181 G>C, OPG 245 T>G, OPG 163 A>G and RANK A>G) in SLE patients with normal bone mineral density (Z-score > -2.0) and low bone mineral density (Z-score ≤ -2.0)

Variable	Bone Mineral Density		Total (n = 211)	P
	Z-score ≤ -2.0 (n = 51)	Z-score > -2.0 (n = 160)		
Age, years	30.7 ± 6.5	34.1 ± 7.3	33.3 ± 7.3	0.003
Disease duration, years	6.5 ± 6.0	7.9 ± 6.1	7.6 ± 6.1	0.142
BMI, kg/m ²	26.3 ± 5.1	27.2 ± 5.2	27.0 ± 5.2	0.233
Cumulative* SLEDAI (mean)	2.4 ± 2.2	2.5 ± 2.0	2.4 ± 2.1	0.889
SDI	0.6 ± 0.8	0.7 ± 0.9	0.7 ± 0.9	0.728
Current GC use, n (%)	45 (88.2)	114 (71.2)	159 (75.4)	0.014
Current GC dose, mg	16.0 ± 14.8	13.9 ± 16.0	14.4 ± 15.7	0.412
Previous* maximum GC dose, mg	47.8 ± 18.8	43.1 ± 21.5	44.3 ± 20.9	0.162
Previous* mean GC dose, mg	20.9 ± 15.1	16.5 ± 15.8	17.5 ± 15.7	0.077
Cumulative* GC dose, g	32.4 ± 25.5	27.4 ± 20.8	28.6 ± 22.1	0.160
Lumbar spine BMD, g/cm ²	0.821 ± 0.065	0.998 ± 0.103	0.955 ± 0.122	<0.001
Femoral neck BMD, g/cm ²	0.680 ± 0.079	0.830 ± 0.116	0.790 ± 0.126	<0.001
Total hip BMD, g/cm ²	0.770 ± 0.082	0.920 ± 0.107	0.880 ± 0.119	<0.001
Bone mineral content, kg	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.3	<0.001
Fat mass, kg	23.3 ± 8.2	25.4 ± 9.5	24.9 ± 9.2	0.165
Lean mass, kg	39.4 ± 5.4	42.3 ± 6.3	41.6 ± 6.2	0.004
Fat percentage, %	35.2 ± 6.3	35.4 ± 6.5	35.3 ± 6.5	0.897
Age of menarche, years	12.6 ± 1.7	12.9 ± 1.6	12.8 ± 1.6	0.198
Parental history of fracture, n (%)	10 (19.6)	28 (17.5)	38 (18.0)	0.733
Parental history of OP, n (%)	7 (13.7)	24 (15.0)	31 (14.7)	0.823
Personal history of fracture, n (%)	4 (7.8)	25 (15.6)	29 (13.7)	0.160
Tobacco use, n (%)	5 (9.8)	14 (8.8)	19 (9.0)	0.783
Calcium intake, mg/day	732.2 ± 512.0	637.4 ± 502.4	660.3 ± 505.1	0.244
Calcium supplementation, n (%)	16 (31.4)	41 (25.6)	57 (27.0)	0.421
Regular physical exercise, n (%)	12 (23.5)	39 (24.4)	51 (24.2)	0.902
Chloroquine use, n(%)	37 (72.5)	118 (73.8)	155 (73.5)	0.866
25OHD serum levels, ng/ml	25.3 ± 10.2	24.4 ± 8.4	24.6 ± 8.9	0.563
25OHD < 30 ng/ml	34 (66.7)	120 (75.0)	154 (73.0)	0.278
25OHD < 20 ng/ml	13 (25.5)	52 (32.5)	65 (30.8)	0.388
25OHD < 10 ng/ml	2 (3.9)	2 (1.3)	4 (1.9)	0.247
RANKL 290 A>G	19 (37.3)	68 (42.5)	87 (41.2)	0.508
OPG 1181 G>C	29 (56.9)	103 (64.4)	132 (62.6)	0.424
OPG 245 T>G	16 (31.4)	29 (18.1)	45 (21.3)	0.044
OPG 163 A>G	48 (94.1)	155 (96.9)	203 (96.2)	0.404
RANK A>G	44 (86.3)	142 (88.8)	186 (88.2)	0.634

Data are shown as mean±SD or number (percentage)

*Last 9 years; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; GC: glucocorticoid; BMD: bone mineral density; OP: osteoporosis; 25OHD: 25-hydroxyvitamin D; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: osteoprotegerin; RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B.

Table 8. Multiple logistic regression analyses for low bone mineral density for chronological age (Z-score $\leq$ -2.0) in SLE patients

Variable	OR	CI (95%)	<i>P</i>
Age, years	0.96	0.923 – 1.007	0.102
Current GC use, n (%)	3.97	1.514 – 10.412	0.005
OPG 245 T>G	2.14	1.017 – 4.500	0.045
Lean mass, kg	0.97	0.933 – 1.006	0.099

GC: glucocorticoid; OPG: osteoprotegerin