

**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 CERZO 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 amor.

Ao meu pai Sergio, por ser meu herói, minha base e minha vida, que me ajudou e 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 sobrevivência 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)- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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.

## **1 INTRODUÇÃO**

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 sobrevivência 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 conseqüente 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).

**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.



1. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallese 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, Luskis 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, 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.
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.