



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

POLIMORFISMOS DO GENE CODIFICANTE DO RECEPTOR DA VITAMINA D (VDR):
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA E
GRAVIDADE DA DOENÇA

ALEXANDRE DOMINGUES BARBOSA

RECIFE
2013

**POLIMORFISMOS DO GENE CODIFICANTE DO RECEPTOR DA VITAMINA D (VDR):
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA E
GRAVIDADE DA DOENÇA**

ALEXANDRE DOMINGUES BARBOSA

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Aplicada à
Saúde do Laboratório de Imunopatologia
Keizo Asami, Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em
Biologia Aplicada à Saúde.**

ORIENTADOR: DR. SERGIO CROVELLA

COORIENTADORA: DRA. PAULA SANDRIN-GARCIA

RECIFE

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barbosa, Alexandre Domingues

Polimorfismo do gene codificante do receptor da vitamina D (VDR): associação com a susceptibilidade à osteoporose pós-menopausa e gravidade da doença/ Alexandre Domingues Barbosa– Recife: O Autor, 2013.

114 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientadora: Paula Sadrin-Garcia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Osteoporose em mulheres 2. Vitamina D 3. Menopausa I. Crovella, Sérgio (orientador) II. Sadrin-Garcia, Paula (coorientadora) III. Título**

616.716

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 264

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISAS E
PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luís Lima Filho

COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO
DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dra. Maria do Carmo Pimentel

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARBOSA, Alexandre Domingues

Título: Polimorfismos do gene codificante do receptor da vitamina d (VDR): associação com a susceptibilidade à osteoporose pós-menopausa e gravidade da doença

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Paula Sandrin-Garcia

Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Jaqueline de Azevedo Silva

Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo restabelecimento de minha saúde que me capacitou para o término desta etapa.

Aos meus familiares, especialmente a minha esposa Jacqueline pela paciência, a minha mãe Edilza pela dedicação e a minha irmã Fernanda pela grande ajuda;

A Dra. Ângela Duarte pela confiança em minha capacidade de coordenar e preceptorar o ambulatório de osteoporose e doenças osteometabólicas do serviço de reumatologia da UFPE;

Aos meus orientadores Dr. Sergio Crovella e Dra. Paula Sandrin-Garcia pela oportunidade, apoio e confiança depositados em mim;

Aos colegas da genética que sempre estiveram dispostos a esclarecer minhas dúvidas;

Ao grupo de coleta pelo cuidado e carinho para com os pacientes

Ao amigo Thiago Sotero pelo incentivo e apoio irrestritos;

A todos meu “muito obrigado” !

RESUMO

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea, predispondo ao risco aumentado de fraturas. A resistência óssea reflete a integração de dois parâmetros principais: densidade e qualidade ósseas. É considerado um importante problema de saúde pública, devido às fraturas por fragilidade óssea e a sua associação com o aumento da mortalidade e morbidade, que resultam em um considerável gasto da economia global. As fraturas do corpo vertebral, quadril e punho são as fraturas típicas da fragilidade óssea gerada pela doença, com custo anual estimado em 20 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos e 30 bilhões de dólares por ano na União Europeia. As células ósseas formadoras de osso, os osteoblastos, possuem receptores para a forma ativa da vitamina D, que quando estimulados favorecem a renovação e manutenção da massa óssea. Além disso, na célula muscular esquelética, a vitamina D também atua através de receptores que envolvem o transporte de cálcio, a síntese proteica e a velocidade de contração muscular. Dessa forma, a vitamina D é de grande importância na função neuromuscular, na cinética da contração muscular e no equilíbrio, fatos que repercutem na capacidade de realizar movimentos rápidos que evitam quedas e possíveis fraturas em indivíduos portadores de baixa densidade mineral óssea. O objetivo desse estudo foi investigar o papel de polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (VDR) na predisposição à osteoporose pós-menopausa em pacientes do Estado de Pernambuco e na modulação do fenótipo patológico da doença. A amostra foi composta por 146 mulheres portadoras de osteoporose pós-menopausa atendidas no serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE; e o grupo controle formado por 95 voluntárias saudáveis da mesma região geográfica. Foram analisados 3 TagSNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) no gene VDR : rs11168268 (A>G); rs1540339(C>T); rs3890733(C>T). Os TagSNPs estavam distribuídos em 3 diferentes regiões no gene, apresentando MAF (minor allele frequency) $\geq 10\%$ e com base nas populações descendentes de Europeus e de Africanos. As análises estatísticas correlacionaram os genótipos/haplótipos com densidade mineral óssea (DMO); sítio da osteoporose (colo de fêmur, fêmur total e coluna vertebral); presença de fraturas por

fragilidade; grupo étnico; número de quedas por ano; insuficiência e deficiência de vitamina D. Não foi constatada associação estatisticamente significativa entre os TagSNPs testados e a osteoporose pós-menopausa. Entretanto, após estratificação dos dados e correlação com as outras variáveis apresentadas pelas pacientes, foi observada associação entre os TagSNPs rs11168268 (A>G) e DMO de fêmur total ($p = 0,042$); rs1540339(C>T) e o grupo étnico de descendentes de europeus ($p = 0,043$); e entre rs3890733(C>T) e mulheres abaixo de 60 anos de idade ($p = 0,043$). Apesar da massa óssea ser influenciada por inúmeras citocinas e hormônios, micronutrientes, atividade física e o meio ambiente onde o indivíduo está inserido, a associação desses TagSNPs com DMO de fêmur total, etnia e idade entre as mulheres pós-menopausadas, confirma a modulação genética do fenótipo da doença osteoporótica.

Palavras-chave: Osteoporose, VDR, SNP.

ABSTRACT

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by compromised bone strength predisposing to an increased risk of fractures. The bone strength reflects the integration of two main parameters: density and bone quality. It is considered a major public health problem due to fragility fractures and their association with increased mortality and morbidity, resulting in a considerable damage on the global economy. The vertebral, hip and wrist fractures are typical of bone fragility caused by the disease, with an annual cost estimated at 20 billion dollars per year in the United States and 30 billion dollars per year in the EUA. The skeletal bone forming cells - the osteoblasts - have receptors for the active form of vitamin D, which when stimulated favor the replacement and maintenance of bone mass. Furthermore, in the skeletal muscle cell, vitamin D also acts through receptors that involve calcium transport, protein synthesis and the speed of muscle contraction. Hence, the importance of this vitamin in neuromuscular function, muscle contraction kinetics and equilibrium, facts that affect the ability to perform rapid movements that prevent falls and possible fractures in individuals with low bone mineral density. The aim of this study is to investigate the role of gene polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) in the predisposition to osteoporosis in postmenopausal patients in the State of Pernambuco and modulation of the pathological phenotype of the disease. The sample consisted of 146 women with postmenopausal osteoporosis treated in the Rheumatology Department, Hospital das Clinicas, UFPE, and the control group of 95 healthy volunteers. Statistical analyzes correlated the genotypes / haplotypes with bone mineral density; site of osteoporosis (femoral neck, hip and lumbar); presence of fragility fractures, race, number of falls per year; insufficiency and deficiency of vitamin D.

We analyzed 3 TagSNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in the VDR gene: rs11168268 (A>G), rs1540339 (C>T), rs3890733 (C>T). The TagSNPs were distributed in three different regions of the gene, with MAF (minor allele frequency) $\geq 10\%$ and based on the populations descended from Europeans and Africans. Statistical analyzes correlated the genotypes / haplotypes with bone mineral density (BMD); site of osteoporosis (femoral neck, total hip and spine); presence of fragility fractures, ethnic group, number of falls per

year; insufficiency and deficiency of vitamin D. There was no statistically significant association between TagSNPs tested and postmenopausal osteoporosis. However, after stratification of the data and correlation with other variables presented by patients, the association was being TagSNPs rs11168268 (A>G) and BMD total hip ($p = 0.042$), rs1540339 (C>T) and Europeans descendants group ($p = 0.043$) and between rs3890733 (C>T) and women below 60 years of age ($p = 0.043$). Although bone mass is influenced by cytokines and hormones, micronutrients, physical activity and the environment, the TagSNPs association with BMD total hip, ethnicity and age among postmenopausal women confirms genetic modulation of the phenotype the osteoporotic disease.

Key words: Osteoporosis, VDR, SNP

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características físicas de um osso processado por desmineralização e calcinação.	18
Figura 2. Características do osso compacto e esponjoso.	19
Figura 3. Canais de Havers.	20
Figura 4. Produtos da degradação do colágeno tipo 1.	21
Figura 5. A modulação da reabsorção óssea via OPG e RANKL.	24
Figura 6. Modulação da atividade osteoblástica através da via Wnt.	25
Figura 7. Modulação da atividade dos osteoblastos e osteoclastos pelos osteócitos.	26
Figura 8. O ciclo de remodelamento.	27
Figura 9. Evolução da massa óssea ao longo dos anos.	29
Figura 10. Classificação da DMO de acordo com o T-Score do DXA.	32
Figura 11. Análise semi-quantitativa das fraturas vertebrais.	37
Figura 12. Fraturas do colo femoral.	38
Figura 13. Fraturas do punho.	40
Figura 14. Incidência das fraturas osteoporóticas de quadril, vertebral e de punho.	41
Figura 15. Vias de metabolismo da vitamina D	45
Figura 16. Polimorfismos do gene codificante do VDR.	53

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Causas de osteoporose secundária.	33
Quadro 2. Fatores de risco para quedas em idosos.	43
Quadro 3. Resultados dos principais estudos sobre a ingesta de cálcio em relação ao genótipo VDR.	58
Quadro 4. Resultados dos principais estudos sobre a ingesta da vitamina D em relação ao genótipo VDR.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 1,25-di-hidroxivitamina D

1-OHase - 1 α -hidroxilase

24-OHase - 24-hidroxilase

25(OH)D - 25-hidroxivitamina D

CTX - Carboxitelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I

CV - Coeficiente de variação

Dkk – Dickkopf

DMO - Densidade mineral óssea

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

DPD – Deoxipiridolina

DXA - Densitometria mineral óssea

FGF-23 - Fator 23 de crescimento dos fibroblastos

GCs – Glicocorticoides

GSK – Quinase sintase do glicogênio

IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IGF-2 Fator de crescimento semelhante à insulina-2

IL1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL6 – Interleucina 6

ISCD - International Society for Clinical Densitometry - Sociedade Internacional de Densitometria Clínica

LRP5 – Receptor 5 relacionado com a lipoproteína de baixa densidade

LRP6 – Receptor 6 relacionado com a lipoproteína de baixa densidade

M-CSF- Fator estimulador de colônia de macrófagos

NCBI - National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional de Informações em Biotecnologia

NTX - Aminotelopectídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPG – Osteoprotegerina

PTH - Paratormônio

PYD – Piridolina

RANK - Fator ativador do receptor nuclear $\kappa\beta$

RANKL - Ligante do fator ativador do receptor nuclear $\kappa\beta$

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

RR – Risco relativo

RXR-VDR - Complexo de receptor da vitamina D com o receptor X do ácido retinoico

SNP - Single Nucleotide Polymorphisms - Polimorfismo de base única

TGF β - Fator de crescimento tumoral β

TNF α - Fator de necrose tumoral α

UVB - Radiação solar ultravioleta B

VDR – Receptor da vitamina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 O OSSO	18
2.1.1 PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO OSSO	18
2.1.2 ESTRUTURA ÓSSEA	19
2.1.3 MATRIZ ÓSSEA	20
2.1.3.1 MATRIZ ÓSSEA: COMPONENTE MINERAL	21
2.1.3.2 MATRIZ ÓSSEA: COMPONENTE CELULAR	22
2.1.4 MODELAÇÃO E REMODELAÇÃO ÓSSEA	26
2.2 PICO DE MASSA ÓSSEA	27
2.3 PERDA ÓSSEA DURANTE O ENVELHECIMENTO	29
2.4 OSTEOPOROSE	30
2.4.1 DEFINIÇÃO	30
2.4.2 FISIOPATOGENIA DA OSTEOPOROSE	31
2.4.2.1 OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA	31
2.4.2.2 OSTEOPOROSE SECUNDÁRIA	31
2.4.3 CLASSIFICAÇÃO DA OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA	32
2.4.4 INDICAÇÃO PARA MEDIÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA	34
2.4.5 FATORES DE RISCO CLÍNICO PARA BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA	34
2.5 FRATURAS	34
2.5.1 EPIDEMIOLOGIA DAS FRATURAS OSTEOPORÓTICAS E CUSTOS ECONÔMICOS	35
2.5.2 FRATURAS VERTEBRAIS	36
2.5.3 FRATURAS DO QUADRIL	38
2.5.4 FRATURAS DE PUNHO	40

2.5.5 FRATURAS NÃO-VERTEBRAIS	41
2.6 FRAX	42
2.7 FATORES DE RISCO RELACIONADOS A QUEDAS	42
2.8 VITAMINA D	44
2.9 GENÉTICA DA OSTEOPOROSE	49
2.10 POLIMORFISMO DO GENE VDR E OSTEOPOROSE	52
2.10.1 FARMACOGENÔMICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DO VDR	57
2.10.1.1 POLIMORFISMOS DO GENE VDR E INGESTA OU SUPLEMENTAÇÃO DE CÁLCIO	57
2.10.1.2 POLIMORFISMOS DO GENE VDR E SUPLEMENTAÇÃO OU TRATAMENTO COM VITAMINA D	61
2.10.2 FUNCIONALIDADE DOS POLIMORFISMOS DO GENE VDR	64
3 OBJETIVOS	67
3.1 OBJETIVO GERAL	67
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ARTIGO	83
CONCLUSÕES FINAIS	113
ANEXO	114

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética que se caracteriza pela perda de massa óssea e alterações de sua microestrutura que predispõem a fraturas de baixo impacto ou por fragilidade.

Os osteoblastos, células de formação óssea, e os osteoclastos, células de reabsorção óssea, funcionam obedecendo a um equilíbrio que mantém uma adequada remodelação óssea, processo responsável pela troca de osso antigo por osso novo. Quando ocorre um desequilíbrio entre a atuação destas células poderá sobrevir uma doença. No caso da osteoporose, a atuação dos osteoclastos torna-se superior a dos osteoblastos.

Estas células são reguladas por diversas citocinas e hormônios que favorecem ou a formação ou a reabsorção óssea. Dentre estas diversas substâncias, a vitamina D representa uma das mais importantes devido a sua atuação na homeostase do cálcio, favorecendo sua absorção intestinal, diminuindo sua perda renal, ou estimulando células de formação óssea ou mesmo inibindo a ação dos osteoclastos.

A ação da vitamina D se dá através da ligação com seu receptor (receptor da vitamina D - VDR) presente em diversos tipos celulares, mas especialmente nas células do epitélio intestinal e nas células ósseas, atuando como um importante modificador da transcrição gênica e na regulação da síntese de RNA mensageiro.

O gene VDR, localizado no cromossomo 12q12-q14, tem sido avaliado para vários polimorfismos de base única (SNPs), sendo os principais: *FokI* (rs10735810) G>A no exon 2, *TaqI* (rs731236) T>C no exon 9, *Tru9I* (rs757343) G>A e *BsmI* (rs1544410) G>A no intron 8. *FokI* ocorre na primeira porção do códon do exon 2 e muda o local de início da tradução, resultando em três aminoácidos menores e, conseqüentemente, uma proteína truncada. Não se sabe ainda se os SNPs *BsmI*, *Tru9I* e *TaqI* possuem efeito funcional na proteína, uma vez que estão localizados em

região intrônica, entretanto esses SNPs podem estar em desequilíbrio de ligação com um SNP funcional dentro do mesmo gene ou com genes adjacentes. Assim, estes três SNPs têm sido utilizados em estudos de associação como marcadores dentro desta região do gene VDR.

Alterações no gene que codifica a proteína do receptor da vitamina D representa uma das linhas de pesquisa na genética da osteoporose, doença que apresenta um caráter multigênico.

Desta forma, este trabalho visa avaliar se polimorfismos no gene codificante da vitamina D associa-se com a diminuição de massa óssea em mulheres pós-menopausadas do Estado de Pernambuco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O OSSO

2.1.1 PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO OSSO

A resistência óssea, ou seja, a capacidade do osso de resistir a fraturas, é determinada pela composição estrutural, mineral e pelas atividades das células ósseas, tais células são responsáveis pelo metabolismo ósseo e a capacidade de reparar danos e microdanos nesse tecido (SEEMAN et al., 2008).

O osso deve ser rígido, porém deve ter a capacidade de resistir a deformações. Deve também ser flexível para absorver a energia da deformidade e não se quebrar. Assim o tecido ósseo suportará compressões e estiramentos sem se danificar (SEEMAN et al., 2008).

No osso demasiadamente rígido, a energia imposta sobre ele provocará desde microfissuras até uma fratura (Figura 1). Se osso é muito flexível, ele se deforma, podendo também se quebrar (SEEMAN et al., 2008).



Figura 1. Características físicas de um osso processado por desmineralização e calcinação. O perônio desmineralizado enrola-se na forma de “nó de gravata”. Se a matriz orgânica for removida é perdida a elasticidade, tornando-se frágil perante traumatismos (Fonte: disponível em < <http://www.lacasadeloptico.com/formacion/anatomia/tejidooseo.html>>).

2.1.2 ESTRUTURA ÓSSEA

Existem dois tipos de ossos, o cortical ou compacto, que corresponde a 80% da massa óssea dos adultos; e, o osso trabecular que corresponde 20% dessa massa óssea (IOLASCON et al., 2013).

O osso trabecular é o mais metabolicamente ativo, pelo fato de apresentar uma maior superfície óssea, abrigando uma maior quantidade de células ósseas (Figura 2). É encontrado também no final dos ossos longos e na parte interna dos ossos chatos. Tem característica esponjosa, cuja função assemelha-se a um amortecedor com capacidade de absorver energia (IOLASCON et al., 2013).

O osso cortical é encontrado na superfície dos ossos largos, como o fêmur, e nas superfícies dos ossos chatos, como vértebras e costelas (Figura 3). É formado por duas lâminas ósseas paralelas, onde se localizam os osteócitos. Estas células estão conectadas entre si através do canal de Havers (SEEMAN et al., 2008; IOLASCON et al., 2013).

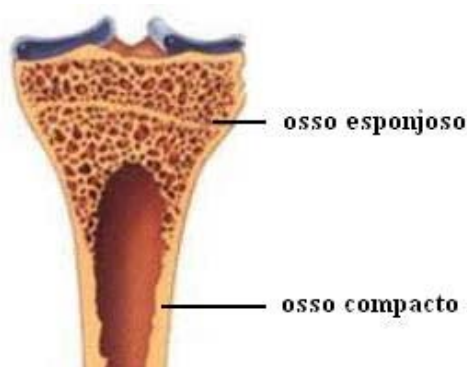


Figura 2. Características do osso compacto e esponjoso. Presença de osso esponjoso ou trabecular no final dos ossos longos e de osso compacto em sua superfície (Fonte: disponível em <<http://educador.brasilescola.com/estrategias-ensino/os-ossos.htm>>).

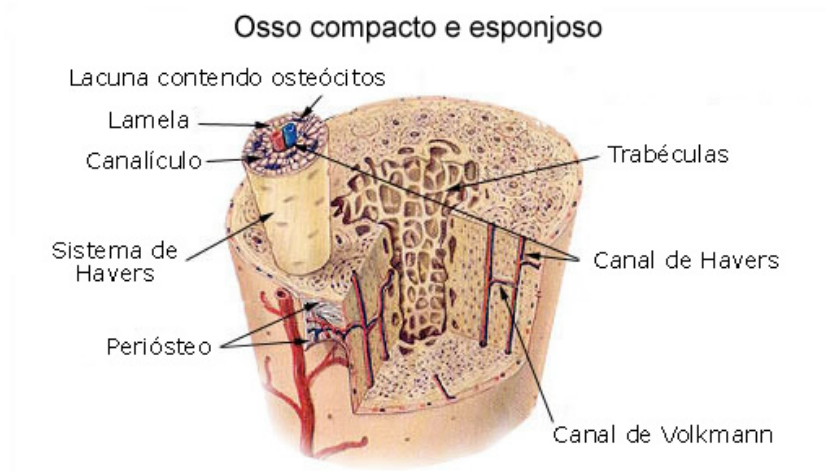


Figura 3. Canais de Havers. Os canais de Havers são formados por um conjunto de estreitos tubos dentro dos ossos por onde passam vasos sanguíneos e células nervosas. As comunicações transversais entre os canais de Havers são chamadas de canais de Valkmann com a mesma função de nutrir e enervar o osso (Fonte disponível em <<http://dc406.4shared.com/doc/er-hrUwI/preview.html>>).

2.1.3 MATRIZ ÓSSEA

A matriz óssea é formada, por componentes proteicos, minerais e celulares. A matriz óssea orgânica é formada predominantemente, de colágeno tipo 1 (cerca de 90% de toda a matriz); e, os outros 10% são representados por proteínas, como os proteoglicanos, osteocalcina e osteonectina (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

O colágeno é produzido dentro das células osteoblásticas. Cada unidade do colágeno é formada por duas cadeias, alfa 1 e alfa 2, que se enroscam formando uma tripla hélice. As fibrilas de colágeno apresentam estabilidade devido às ligações cruzadas entre essas cadeias. Elas se agrupam para forma as fibras de colágeno que contribuem para a flexibilidade do osso (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Além disso, a matriz óssea também possui fatores de crescimento, como os fatores de crescimento semelhantes à insulina - I e II (IGF-I e II), cujo maior reservatório está no tecido ósseo (SEEMAN et al., 2008). A Figura 4 apresenta os produtos de degradação do colágeno que são utilizados como marcadores da taxa de remodelação óssea (SARAIVA;

LAZARETTI-CASTRO, 2002).

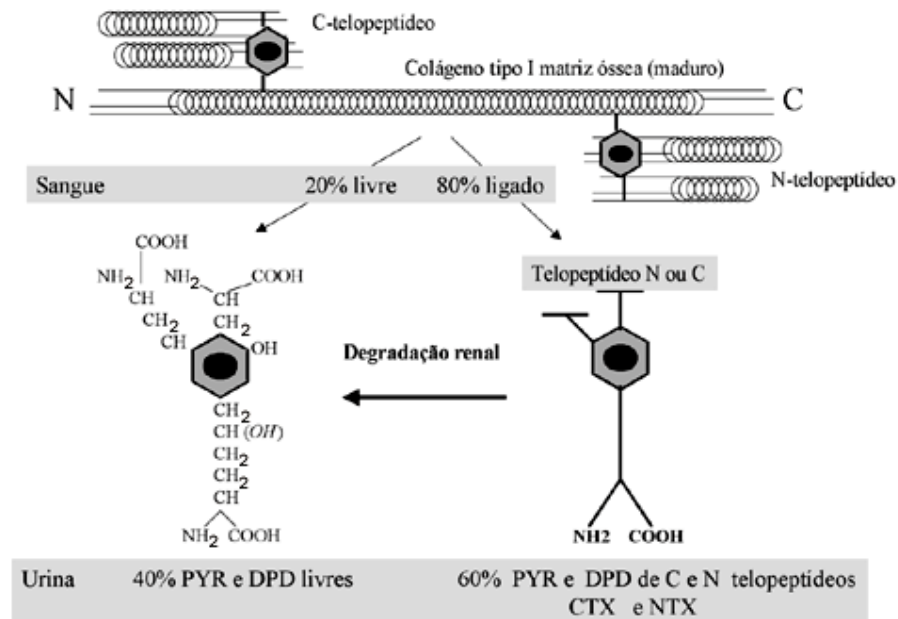


Figura 4. Produtos da degradação do colágeno tipo 1. As moléculas de colágeno tipo 1 da matriz óssea são interligadas por moléculas de piridinolinas (PYD) e deoxipiridinolinas (DPD) nas regiões carboxi (C) e amino (N) terminais. Durante o processo de reabsorção óssea conduzido pelo osteoclasto a maioria das moléculas de PYD, liberadas para circulação, está ainda ligada a fragmentos carboxiterminal (CTX) e aminoterminal (NTX) do colágeno. Após a degradação no rim, um percentual maior de formas livres é excretado pela urina, juntamente com as formas ainda ligadas. A taxa desses produtos de degradação mensurados no soro e na urina é utilizada para avaliar a taxa de remodelação óssea. (Fonte: SARAIVA; Lazaretti-Castro, 2002).

2.1.3.1 MATRIZ ÓSSEA: COMPONENTE MINERAL

O maior componente mineral que é depositado ao longo dos espaços entre as fibras de colágeno são os cristais de hidroxiapatita. Tais cristais são formados por cálcio e fósforo, que representa 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo corporal total (DIARRA, 2007; SEEMAN et al., 2008; LEWIECKI, 2011).

A mineralização óssea ocorre em duas fases. Uma fase inicial, na qual mais de 70% da matriz colágena é mineralizada em poucos dias, chamada de mineralização primária. E, uma fase mais lenta, com duração de 3 a 6 meses, chamada de mineralização secundária, caracterizada pela maturação dos minerais, com alteração do seu tamanho, composição e

estrutura. As alterações no processo de mineralização influenciam na rigidez, contribuindo para a resistência óssea (DIARRA, 2007; SEEMAN et al., 2008; LEWIECKI, 2011).

2.1.3.2 MATRIZ ÓSSEA: COMPONENTE CELULAR

O osso é constituído por quatro tipos celulares responsáveis pelo metabolismo ósseo: o osteoclasto, o osteoblasto, o osteócito e as células de revestimento ósseo. Os osteoclastos e os osteoblastos são em menor número e localizam-se nos sítios de remodelamento ósseo. Os osteócitos representam o maior número de células ósseas. Já as células de revestimento, cuja função exata ainda é desconhecida, recobrem a superfície do osso (ASADA, 2013). Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas de precursores hematopoiéticos da linhagem monócito-macrófago. São as únicas células capazes de reabsorver o osso mineralizado (ASADA, 2013; MEBAREK et al., 2013; SIDDIQUI; OWEN, 2013).

A primeira parte desse processo de reabsorção é a ligação dessas células ao osso, cujo processo é mediado por várias proteínas, como as integrinas, as osteopontinas, as fibronectinas, o colágeno e a sialoproteína óssea (ASADA, 2013; MEBAREK et al., 2013).

Uma vez ligados ao osso, os osteoclastos formam uma membrana, que aumenta a área de interface para a reabsorção óssea. No interior deste sítio de absorção são produzidos íons hidrogênio, que acidificam esta região, dissolvendo o osso mineralizado. Além disso, são produzidas enzimas lisossomiais, como a collagenases e metaloproteinases, que digerem os componentes orgânicos da matriz óssea (ASADA, 2013; MEBAREK et al., 2013).

Existem diversos mecanismos reguladores da atividade dos osteoclastos. A calcitonina inibe a função osteoclástica quando se liga ao seu receptor na superfície dessas células, o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o ligante do fator ativador do receptor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), produzidos pelos osteoblastos e importantes para a osteoclastogênese. O M-CSF e o RANKL aumentam a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, com consequente reabsorção óssea (LACATIVA;

FARIAS, 2010; TERAUCHI, 2011; BRAUN; SCHETT, 2012).

A Osteoprotegerina (OPG) presente no microambiente ósseo e também secretada pelos osteoblastos tem a função de bloquear a interação do RANKL com o receptor RANK e dessa forma regula fisiologicamente a reabsorção óssea (KILLOCK, 2011; XIONG; O'BRIEN, 2012).

Diversas citocinas, vitaminas, hormônios, atuam sobre a osteoclastogênese e sobre a reabsorção óssea por influenciar a produção do RANK-L e da OPG (LEWIECKI, 2011). Citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), aumentam a produção do RANKL, aumentando a ação dos osteoclastos (PACIFICI, 1996; KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

A 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH) $_2$ D) diminui a produção do RANKL, diminuindo a ação dos osteoclastos. O paratormônio (PTH) e os glicocorticoides (GCs) aumentam a produção de RANKL e inibem a produção de OPG, favorecendo a reabsorção óssea (Figura 5). O estrogênio e o fator de crescimento tumoral β (TGF β) aumentam a produção de OPG pelos osteoblastos, inibindo a osteoclastogênese. O Interferon- γ inibe o RANKL inibindo a reabsorção óssea (PACIFICI, 1996; KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

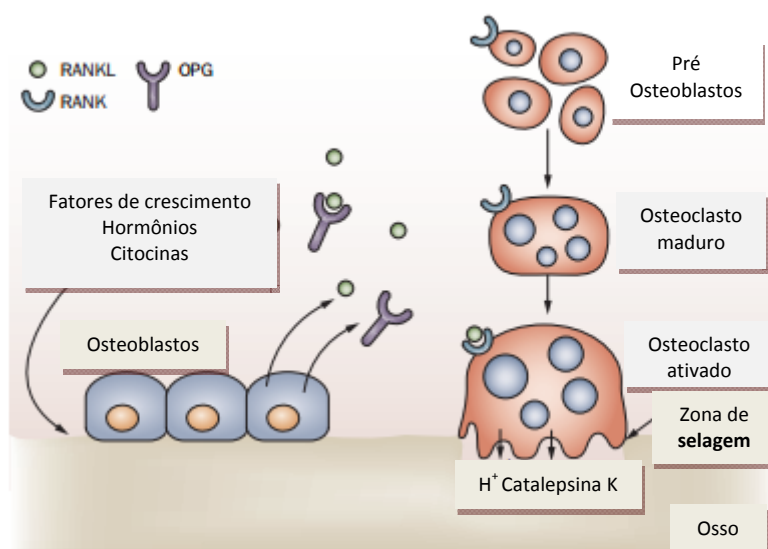


Figura 5. A modulação da reabsorção óssea via OPG e RANKL. Os osteoblastos produzem RANKL que se liga ao receptor RANK nos osteoclastos ativando a osteoclastogênese. Também produzem OPG que se liga ao RANKL inibindo-o e, dessa forma, modulando a reabsorção óssea. (Fonte: adaptada de LEWIECKI, 2011).

Os osteoblastos são células cuboides, organizadas em uma linha monocelular ao longo da matriz osteoide. São derivados de células estromais pluripotentes e responsáveis pela formação e mineralização óssea. Eles sintetizam e secretam IGF-I e TGF β na matriz (KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

Uma importante descoberta é a via de sinalização Wnt (Figura 6). Estas moléculas ligam-se aos receptores “frizzled” e aos seus co-receptores 5 e 6 relacionados com a lipoproteína de baixa densidade (LRP5/6). Essa interação inibe a quinase-sintase do glicogênio (GSK), levando ao acúmulo da β -catenina no citossol do osteoblasto, a qual é translocada para o núcleo celular, produzindo alterações da expressão de genes, culminando com maior atividade osteoblástica (KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

Por outro lado, nesta via de sinalização a atividade do co-receptor do LRP5/6 pode ser inibida pela esclerostina (produto do gene SOST) e pela Dickkopf (Dkk), levando respectivamente, a uma degradação da β -catenina (via ligação com o SOST) ou a uma degradação do receptor LRP5/6 (via ligação com o Dkk). Através dessa via de inibição a

atividade osteoblástica é diminuída (KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

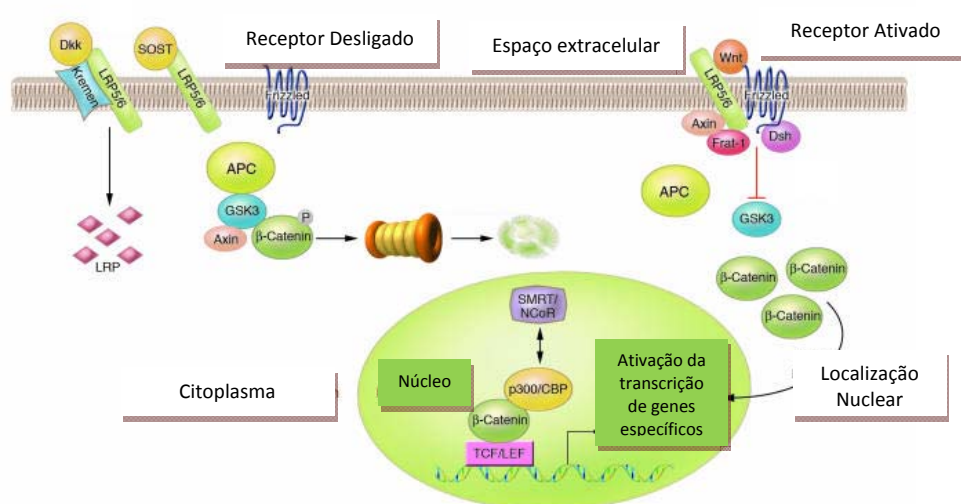


Figura 6. Modulação da atividade osteoblástica através da via Wnt. A proteína Wnt ligada ao seu receptor/co-receptor LPR5/6 leva a um aumento na concentração de β -catenina no citoplasma do osteoblasto, que quando translocada para o núcleo celular ativa a transcrição de genes específicos responsáveis pela osteoblastogênese. Por outro lado, a função dos co-receptores LPR 5/6 pode ser inibida pela ação das proteínas esclerostina e Dickkopf levando a uma diminuição da formação óssea (Fonte: adaptada de KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006).

Os osteócitos são derivados dos osteoblastos que se aprisionaram durante a formação da matriz óssea, em lacunas. São pequenos, achatados e conectam-se uns aos outros por extensões citoplasmáticas, formando uma verdadeira rede na superfície óssea (KILLOCK, 2011; XIONG; O'BRIEN, 2012; MANOLAGAs, 2013).

Dados recentes indicam que os osteócitos são importantes vigilantes da integridade da estrutura óssea. Eles possivelmente trabalham como sensores mecânicos, que são estimulados por deformidades ou microfissuras (Figura 7). Essas alterações sinalizam para o osteócito a necessidade de uma remodelação e reestruturação óssea naquela região. Deficiência de estrogênio, terapia por glicocorticoides e idade avançada levam a uma maior apoptose dos osteócitos com um efeito prejudicial à resistência óssea (KILLOCK, 2011; XIONG; O'BRIEN, 2012; MANOLAGAs, 2013).

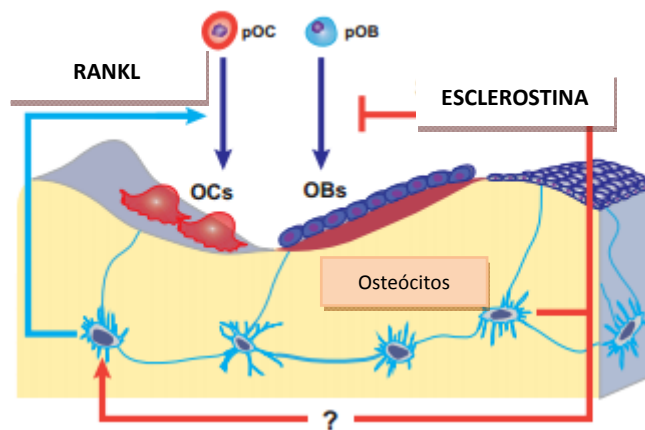


Figura 7. Modulação da atividade dos osteoblastos e osteoclastos pelos osteócitos. Os osteócitos são ativados por alterações da microestrutura óssea como microfissuras. Eles tanto estimulam a produção de RANKL para ativar a reabsorção óssea naquela região como inibem a produção de esclerostina ativando, assim mais osteoblastos. Porém essa via de sinalização que parte dos osteócitos ainda é pouco conhecida (Fonte: adaptada de MANOLAGAS, 2013).

2.1.4 MODELAÇÃO E REMODELAÇÃO ÓSSEA

Os mecanismos celulares responsáveis pela adaptação do osso são os de modelação, isto é, construção; e, remodelação, ou seja, reconstrução. Esses dois processos estão acoplados e são responsáveis pela homeostase de todo o esqueleto (LINDSAY, 2004; McLEAN, 2009; THOMAS, 2010; INADA; MIYAURA, 2010).

O ciclo de remodelamento ósseo é uma sequência coordenada de ativação celular, reabsorção e formação de novo osso (Figura 8). O remodelamento ósseo é feito por osteoclastos, que removem o tecido ósseo antigo, e pelos osteoblastos, que produzem nova matriz óssea, que amadurece e se mineraliza (LINDSAY, 2004; McLEAN, 2009; THOMAS, 2010; INADA; MIYAURA, 2010).

O crescimento ósseo ocorre como resultado do modelamento, renovação da massa óssea, com alterações no tamanho e nas formas dos ossos. Na modelação óssea há atuação predominante das células osteoblásticas com formação de osso novo e com uma duração de três a quatro meses. Os osteoclastos atuam reabsorvendo osso velho em um processo com duração de três semanas. Percebe-se que a retirada de osso é mais rápida que sua

formação (LINDSAY, 2004; McLEAN, 2009; THOMAS, 2010; INADA; MIYAURA, 2010).

A saúde óssea é mantida por um contínuo remodelamento ósseo que depende de um equilíbrio entre as funções destas células. A perda óssea ocorre quando a reabsorção excede a formação óssea (LINDSAY, 2004; McLEAN, 2009; THOMAS, 2010; INADA; MIYAURA, 2010).

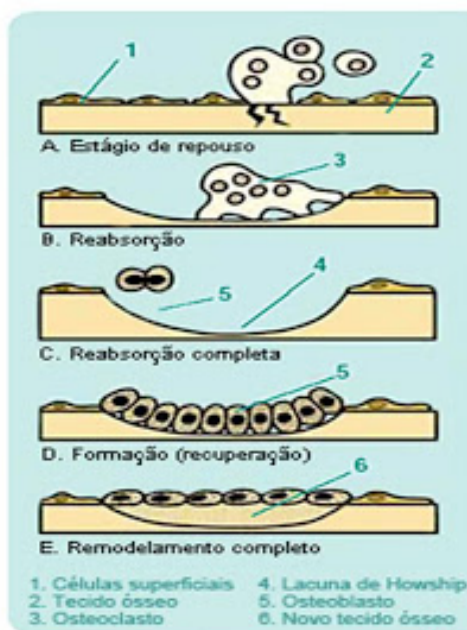


Figura 8. O ciclo de remodelamento. O remodelamento ósseo inicia-se com a ativação dos osteoclastos que reabsorvem osso antigo e continua com a ação dos osteoblastos que forma nova matriz óssea que se mineraliza formando novo osso (Fonte: disponível em <<http://hbfarma.blogspot.com.br/2009/01/osteoporose.html>>).

2.2 PICO DE MASSA ÓSSEA

Durante a infância e a adolescência os processos de modelação e remodelação estão envolvidos para determinar um pico de massa óssea, além da geometria e resistência óssea. Os ossos crescem por aposição periosteal, ou seja, crescimento em largura, e por ossificação endocondral, ou seja, crescimento em comprimento. Durante a infância o processo de modelação óssea ocorre primeiramente na superfície periosteal, e

na puberdade ocorre a ossificação endocondral (MATKOVIC et al., 1990; LI et al., 2003).

Em adultos jovens saudáveis a fase reabsortiva do ciclo de remodelação remove o osso danificado e a fase de formação restaura toda a estrutura óssea. Cada ciclo leva em torno de 90 a 130 dias. Os ciclos de remodelação e reabsorção óssea estão acoplados e são regulados pelo balanço entre o RANKL e a OPG. Quando é finalizado o ciclo de remodelação, a mineralização do osso novo continua. Esse “turnover” ósseo é essencial para prevenir o acúmulo de osso velho, bem como é importante no reparo de microfraturas e alterações da arquitetura óssea a estímulos repetidos (KILLOCK, 2011; XIONG; O'BRIEN, 2012; LI et al., 2003).

O pico de massa óssea é o máximo de massa ou densidade óssea atingida durante a vida. Diferentes sítios esqueléticos alcançam esse pico em momentos diferentes: o trocanter do fêmur, no meio da adolescência; o colo femoral, no final da adolescência; e as vértebras, em torno dos vinte anos. Existem vários fatores que influenciam esse pico de massa óssea, como o sexo, a etnia, a ingestão de cálcio e vitamina D, a realização de exercícios físicos e vícios como tabagismo e alcoolismo. A herança genética é responsável por cerca de 80% desse pico de massa e os 20% restantes estão relacionados com os fatores ligados ao estilo de vida (MATKOVIC et al., 1990; PACIFICI, 1996; LI et al., 2003).

O pico de massa óssea é alcançado logo após a adolescência, em torno dos 25-30 anos. Essa massa óssea é mantida por algum tempo, e posteriormente, a perda óssea se inicia (Figura 9). Primeiramente, ela ocorre na ordem de 0,5 a 1% ao ano e se acelera nas mulheres após a menopausa na ordem de 1 a 2% ao ano. A perda óssea relacionada à idade progride culminando com massa óssea equiparável aos níveis da pré-adolescência (Figura 9) (MATKOVIC et al., 1990; LI et al., 2003).

Em média, a densidade mineral óssea (DMO) é maior em homens do que em mulheres, e maior em negros do que em brancos (LI et al., 2003).

Mutações em genes responsáveis pela produção do colágeno tipo I, RANKL, OPG e das proteínas da via de sinalização Wnt podem provocar alterações no pico de massa óssea. Outras mutações no gene que codifica o receptor da Vitamina D (VDR) parecem alterar o pico de massa óssea bem como aumenta o risco futuro de fraturas (KRISHNAN; BRYANT; MacDOUGALD, 2006; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

A atividade física durante o crescimento tem efeito positivo na formação do osso. Uma nutrição adequada, especialmente enriquecida com cálcio, vitamina D e proteínas são importantes na fase pré-puberal, que parece ser uma janela de oportunidades para modificar fatores ambientais e adquirir uma adequada massa óssea. O uso de algumas medicações durante a infância e adolescência como os GCs e as drogas citostáticas prejudicam a aquisição de um pico ósseo ideal, de maneira que nesses indivíduos uma terapia preventiva deve ser instituída (MATKOVIC et al., 1990; LI et al., 2003).

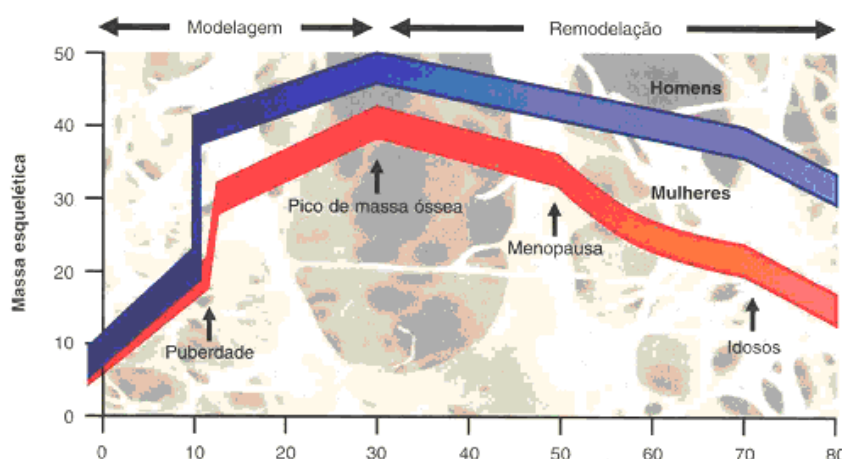


Figura 9. Evolução da massa óssea ao longo dos anos. Durante a puberdade há um grande aumento de massa óssea que se mantém até em torno dos 30 anos. Posteriormente, inicia-se uma perda óssea que é maior nas mulheres que nos homens e acelera-se logo após a menopausa (Fonte: disponível em <<http://www.brevesdesaude.com.br/ed02/osteoporosel.htm>>).

2.3 PERDA ÓSSEA DURANTE O ENVELHECIMENTO

A perda óssea é uma inevitável consequência do envelhecimento e se inicia logo após o início do pico de massa óssea. Tal perda se acelera na menopausa e continua por toda a vida, tanto em homens quanto em mulheres (ALBRIGHT, 1947).

A perda de massa óssea é o resultado de um hipogonadismo persistente em mulheres, de um hipogonadismo que surge em alguns homens, ou ainda um hiperparatireoidismo secundário em indivíduos idosos, associado com a deficiência de cálcio e vitamina D e imobilidade (RAISZ, 2005; SOLIMEO; WEBER; GOLD, 2011).

Estima-se que 50% de osso trabecular e 35% de osso cortical são perdidos ao longo da vida em mulheres. Nos homens essa perda é de aproximadamente dois terços (ALBRIGHT, 1947).

Em nível celular duas formas de perda óssea podem ser reconhecidas. Em uma primeira, há um aumento do número das unidades de remodelamento ósseo. Dessa forma, muito mais osso mineralizado é removido e menos osso jovem é mineralizado, contribuindo para uma fragilidade óssea. Em outra, a reabsorção óssea é mais acentuada gerando um desequilíbrio no processo de remodelação óssea (RAISZ, 2005; SOLIMEO; WEBER; GOLD, 2011).

Como os ossos trabeculares apresentarem uma maior área quando comparados com os ossos corticais, teremos naqueles muito mais sítios de remodelação por unidade de volume. Dessa forma uma quantidade muito maior de osso trabecular é perdida (SOLIMEO; WEBER; GOLD, 2011)

A perda do osso trabecular em mulheres é caracterizada pela perda da conectividade entre as trabéculas, enquanto que nos homens é mais observado o afinamento das trabéculas. Durante a perda do osso cortical ocorre o aumento da sua porosidade com diminuição da sua resistência (SOLIMEO; WEBER; GOLD, 2011).

2.4 OSTEOPOROSE

2.4.1 DEFINIÇÃO

O conceito da osteoporose sofreu modificações ao longo dos anos, à medida que a sua fisiopatogenia foi sendo mais bem compreendida. Antigamente, a osteoporose era definida apenas como uma quantidade reduzida de osso qualitativamente normal. Posteriormente, foi considerada uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma baixa massa óssea e uma deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade às fraturas. Mais recentemente, a osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea, predispondo ao risco aumentado de fraturas. A

resistência óssea reflete a integração de dois parâmetros principais: densidade e qualidade ósseas (ALBRIGHT, 1947; CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993; NIH, 2001).

2.4.2 FISIOPATOGENIA DA OSTEOPOROSE

2.4.2.1 OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA

O estrogênio é um dos principais participantes da remodelação óssea fisiológica nas mulheres. Ele controla a remodelação óssea, através de vários mecanismos. Sua deficiência após a menopausa leva a um aumento na frequência de ativação das unidades de remodelação. Como o aumento da reabsorção não é compensado pelo aumento da formação óssea, uma vez que aquele ocorre mais rapidamente que este, teremos uma diminuição da massa óssea com alterações da microarquitetura do osso (PERCEGONI et al., 2009; TERAUCHI, 2011; BRAUN; SCHETT, 2012; RAHNAMA et al., 2013).

A produção de citocinas como Interleucina 1 (IL-1), IL-6, TNF α está aumentada na pós-menopausa. Essas substâncias aumentam a produção do fator M-CSF, o qual além de aumentar a meia-vida do osteoclasto, leva à formação e diferenciação das células pré-osteoclásticas em osteoclastos maduros (TERAUCHI, 2011; BRAUN; SCHETT, 2012)

Na pós-menopausa, o balanço RANKL e OPG está alterado. O RANKL está aumentado e a OPG está diminuída, o que favorece a osteoclastogênese. Por outro lado, a deficiência do estrogênio diminui a vida dos osteoblastos e osteócitos, o que impede a detecção de microdanos e a sua imediata reparação (PACIFICI, 1996; TERAUCHI, 2011; BRAUN; SCHETT, 2012; RAHNAMA et al., 2013).

2.4.2.2 OSTEOPOROSE SECUNDÁRIA

O termo osteoporose secundária refere-se a uma baixa DMO com um aumento do risco de fraturas, relacionada a doenças ou medicamentos. Uma avaliação das causas secundárias é indicada em todos os pacientes portadores de osteoporose e naqueles com

fraturas de fragilidade (KANIS et al., 1994; ORLIC; RAISZ, 1999; BOURS et al., 2011).

No Quadro 1 estão relacionadas algumas causas de osteoporose secundária.

2.4.3 CLASSIFICAÇÃO DA OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA

A Organização Mundial de Saúde em 1994 definiu os critérios para o diagnóstico da osteoporose. Para tal é necessário a realização de um exame de densitometria mineral óssea (DXA). Nesta avaliação o item T-Score compara a DMO de um indivíduo portador de baixa massa óssea com o valor médio esperado para adultos jovens e expressa essa diferenças sob a forma de desvio padrão (DP) (WHO, 1994; KANIS et al., 1994).

Uma DMO é considerada normal quando o T-Score é igual ou maior que -1,0 DP. Existe osteopenia ou baixa DMO quando o T-Score encontra-se entre -1,0 e -2,5 DP. Osteoporose é definida quando o T-Score é igual ou inferior -2,5 DP (Figura 10). Chamamos de osteoporose grave ou estabelecida quando o T-Score está abaixo de -2,5 DP e o indivíduo apresenta uma fratura por fragilidade associada (WHO, 1994; KANIS et al., 1994).

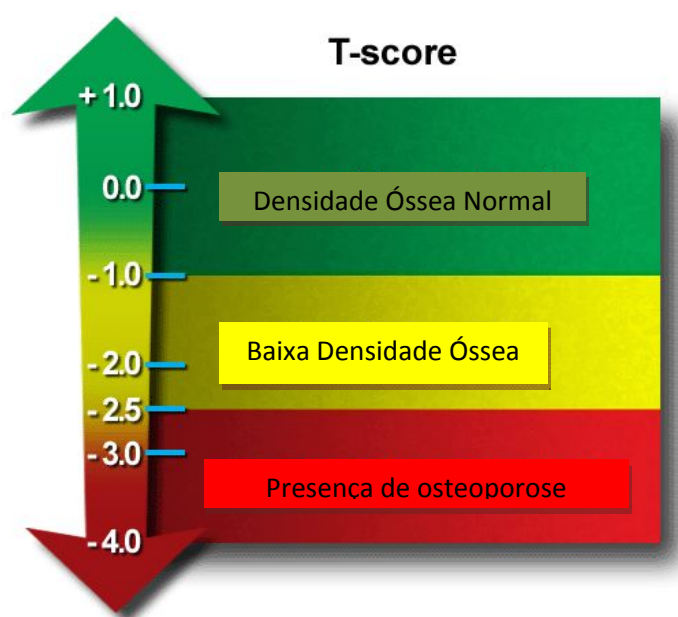


Figura 10. Classificação da DMO de acordo com o T-Score do DXA. Classifica-se osteopenia ou baixa densidade mineral óssea quando o T-Score situa-se entre -1,0 e -2,5 e osteoporose quando o T-Score é igual ou menor que -2,5 (Fonte: disponível em http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/test_procedures/orthopaedic/bone_density_92,p07664/>)

Quadro 1. Causas de osteoporose secundária (KANIS et al., 1994; ORLIC; RAISZ, 1999; BOURS et al., 2011).

CAUSAS	DOENÇAS RELACIONADAS
Endocrinopatias	Tireotoxicose, Hiperparatireoidismo, Síndrome de Cushing, Diabetes Mellitus tipo-I, Acromegalia e Hipercalcúria
Drogas	Glicocorticoides, Inibidores da aromatase, Heparina, Hormônio tireoidiano, Fenobarbital, Fenitoína e Ciclosporina
Alterações Nutricionais e Gastrointestinais	Doença inflamatória intestinal, Síndromes desabsortivas, Desnutrição e Gastrectomia
Distúrbios Genéticos	Síndrome de Ehlers-Danlos, Síndrome de Marfan, Homocistenúria e Osteogenesis Imperfecta
Alterações Neurológicas	Doença de Parkinson, Sequela de AVC e Distrofia muscular
Hipogonadismo	Anorexia nervosa, Hiperprolactinemia, Síndrome de Turner e Klinefelter e Ooforectomia bilateral ou orquiectomia
Doenças Hematológicas/Malignidade	Mieloma múltiplo, Mastocitose, Hemofilia e Talassemia
Outras Causas	Artrite reumatoide, Espondilite anquilosante, Doença pulmonar obstrutiva crônica, Lúpus eritematoso sistêmico, Insuficiência renal crônica, Imobilização, Sarcoidose, Amiloidose e Transplante de órgãos

2.4.4 INDICAÇÃO PARA MEDIÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

De acordo com a Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD) o DXA deve ser realizado em: mulheres com idade igual ou superior a 65 anos, mulheres após a menopausa com idade inferior a 65 anos e com fatores de risco clínico para baixa DMO, homens com idade igual ou superior a 75 anos, adultos com fratura por fragilidade, adultos com doença ou condição associada à baixa massa óssea ou perda de massa óssea, adultos em uso de medicamentos associados com baixa massa óssea ou perda de massa óssea, qualquer indivíduo candidato ao tratamento farmacológico para o tratamento da osteoporose, qualquer indivíduo em tratamento para monitoramento anti-osteoporótico para monitoramento do seu efeito (LEIB et al., 2004).

2.4.5. FATORES DE RISCO CLÍNICO PARA BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

Alguns fatores de risco clínico são descritos como associados à baixa densidade mineral óssea e são utilizados para selecionar indivíduos a realização da densitometria óssea a fim de avaliar a densidade mineral: perda de altura, baixo peso corporal, idade avançada, menarca tardia, menopausa, tempo de menopausa e tabagismo (RIGGS; MELTON, 1986).

2.5 FRATURAS

Existem diferentes tipos de fraturas, como as traumáticas, decorrentes de trauma de alto impacto; as fraturas patológicas, que ocorrem em local previamente fragilizado por algum processo tumoral, infeccioso, ou por distúrbio ósseo hereditário; as fraturas de stress, caracterizadas por um traço de fratura em fio de cabelo resultante de stress repetido, e as fraturas osteoporóticas, que são fraturas por fragilidade, trauma de baixa energia, trauma mínimo, tais como aqueles resultantes de uma força igual ou inferior a uma queda da própria altura. As fraturas do quadril, corpo vertebral e punho são as fraturas típicas da fragilidade óssea gerada pela osteoporose (GARRAWAY et al , 1979).

A incidência de fraturas é bimodal, com picos na juventude, entre 15 e 25 anos e após os 45 anos. Em pessoas jovens, as fraturas dos ossos longos predominam, frequentemente ocorrendo após traumas significativos. Sua incidência é maior em homens do que em mulheres. Acima dos 45 anos, a incidência de fraturas em mulheres aumenta de tal forma que a taxa de fraturas no sexo feminino torna-se duas vezes maior que a do sexo masculino estando associada à fragilidade (GARRAWAY et al, 1979).

2.5.1 EPIDEMIOLOGIA DAS FRATURAS OSTEOPORÓTICAS E CUSTOS ECONÔMICOS

A osteoporose tornou-se um importante problema de saúde pública, devido às fraturas por fragilidade óssea e a sua associação com o aumento da mortalidade e morbidade, que resultam em um considerável gasto da economia global (MELTON, 1996; LINDSAY et al., 1998; VAN STAA et al., 2001; KANIS, 2011).

As fraturas osteoporóticas ocorrem especialmente em indivíduos mais velhos, e como a expectativa de vida está aumentando em todo mundo, esse tipo de fratura também tende a aumentar. Estima-se que o número de pessoas acima dos 65 anos aumentará de 323 milhões em 1990 para 1 bilhão e 555 milhões em 2050 (MELTON, 1996; LINDSAY et al., 1998).

A taxa de fratura ajustada pela idade se mantém estável na América do Norte e na Europa Ocidental, mas os percentuais continuam a aumentar em outras partes do mundo, como na Ásia. Além disso, mesmo se a taxa de incidência de fraturas do quadril se mantenha estável, o número de novas fraturas de quadril em todo mundo aumentará de 1,7 milhões em 1990 para 6,3 milhões em 2050. Considerando que essa taxa tenha um aumento de 1% ao ano, o número de fraturas de quadril em todo mundo poderá ser maior que 8,2 milhões em 2050 (VAN STAA et al., 2001; KANIS, 2011).

A incidência de fraturas nos EUA é de aproximadamente 1,5 milhões de fraturas osteoporóticas por ano. Compreende 700.000 fraturas vertebrais, 300.000 de quadril, 250.000 de punho e 300.000 outras fraturas (KANIS, 2011).

O custo anual das fraturas osteoporóticas é estimado em 20 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos e 30 bilhões de dólares por ano na União Europeia (VAN STAA et

al., 2001).

Na população caucasiana, cerca de 50% das mulheres e 20% dos homens, com idade acima de 50 anos, terá pelo menos uma fratura por fragilidade no restante da sua vida (LINDSAY et al., 1998).

Em estudos prospectivos, observa-se um risco aumentado de quase todos os tipos de fraturas em indivíduos com baixa DMO. Contudo, naqueles que já tiveram algum tipo de fratura existe um risco maior de ter novas fraturas (KANIS, 2011).

2.5.2 FRATURAS VERTEBRAIS

As fraturas vertebrais representam as fraturas osteoporóticas mais comuns, com aproximadamente 550.000 fraturas ao ano. Essas fraturas podem ser em acunhamento, bicôncavas ou em achatamento, sendo classificadas em leve, moderada ou grave (Figura 11). Em mulheres, a incidência das fraturas vertebrais clinicamente sintomáticas aumenta em torno dos 55 a 60 anos; e nos homens, aumentam em torno dos 75 anos (COOPER et al., 2011).

Como marcador de risco para futuras fraturas, o indivíduo portador de fratura vertebral apresenta um risco relativo (RR) de 4.4 para uma nova fratura vertebral, um RR de 2.3 para uma fratura de quadril e um RR de 1.4 para uma fratura de antebraço (KLOTZBUECHER et al., 2000).

A maioria dessas fraturas ocorre durante a realização de atividades do cotidiano, devido ao esforço de levantar, empurrar ou puxar objetos (GOLD, 2001; HARRISON et al., 2007).

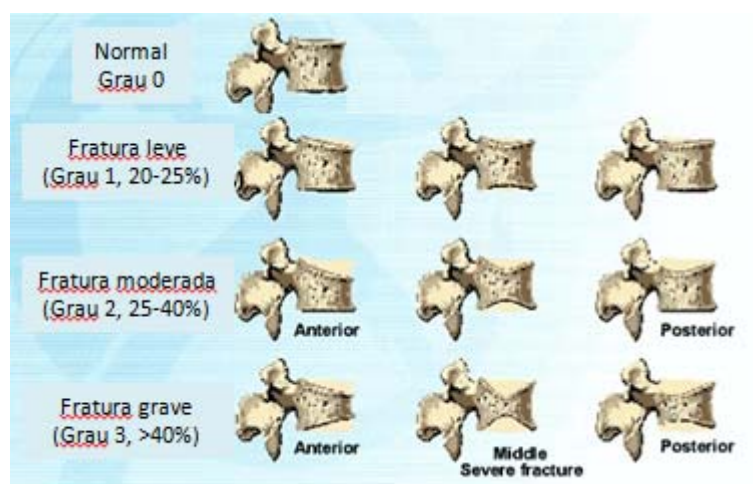


Figura 11. Análise semi-quantitativa das fraturas vertebrais. Uma perda de 20 a 25% da massa do corpo vertebral corresponde a um pequeno colapso, perdas entre 25 a 40% do corpo vertebral representam colapsos moderados; os severos apresentam uma perda maior de 40% (Fonte: adaptada de GENANT, H. K. et al., 1993).

Cerca de 70% dessas fraturas são consideradas fraturas morfológicas assintomáticas e observadas apenas em radiografias. Apenas 30% delas observadas ao raio-x são consideradas sintomáticas, com o seu portador apresentando intensa dor (GOLD, 2001; HARRISON et al., 2007).

Dentre as consequências das fraturas vertebrais temos dor nas costas; perda de estatura; deformidade como cifose; redução da capacidade vital pulmonar em até 9% e, diminuição na qualidade de vida, com dependência de analgésicos, distúrbios do sono, depressão e perda da autoestima (GOLD, 2001; HARRISON et al., 2007).

A prevalência dos achados radiográficos aumenta com a idade, e 1 em cada 8 indivíduos acima de 50 anos de idade na Europa apresenta deformidade vertebral secundária à fratura (GOLD, 2001; HARRISON et al., 2007).

O estudo EVOS, o qual avaliou fraturas vertebrais entre países europeus, demonstrou as diferentes taxas existentes entre essas populações. Variações geográficas na prevalência e incidência de fraturas vertebrais são menores do que as do quadril. Radiografias foram realizadas inicialmente e repetidas durante o seguimento. A incidência de todas as fraturas vertebrais foi de 3 vezes a das fraturas de quadril. Na Europa, em indivíduos com idade entre 75 e 80 anos, a incidência de fraturas vertebrais

foi encontrada numa taxa de 13,6 fraturas por 1000 homens ao ano e 29,3 fraturas por 1000 mulheres ao ano (MATTHIS et al., 1998).

Nas mulheres idosas sem fratura vertebral a taxa de diminuição da altura é em torno de 2 mm/ano, porém em mulheres com fraturas, essa taxa aumenta de 5 mm/ano (HARRISON et al., 2007).

2.5.3 FRATURAS DO QUADRIL

As fraturas do quadril representam a segunda fratura osteoporótica mais comum, com aproximadamente 300.000 ocorrências por ano em todo mundo (Figura 12). Podem ocorrer no colo femoral, em aproximadamente 40%, na região intertrocantérica, também em torno de 40%, ou em outros locais do quadril (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992; MELTON, 1996; RAY et al., 1997).



Figura 12. Fraturas do colo femoral. As fraturas de quadril ocorrem entre indivíduos mais idosos e apresentam grande morbimortalidade (Fonte: disponível em <<http://saude.ig.com.br/minhasaude/enciclopedia/osteoporose/ref1238131529684.html>>).

As fraturas do quadril representam as mais sérias consequências da osteoporose em termos de morbidade e mortalidade, uma vez que apresenta uma taxa de 20 a 30% de morte no primeiro ano após o evento. Além disso, 20% dos indivíduos fraturados

apresentam uma mobilidade severamente comprometida após o primeiro ano, requerendo longo tempo de cuidados médicos, e metade das mulheres que fraturam o quadril se mantém com algum prejuízo na mobilidade (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992; MELTON, 1996; RAY et al., 1997).

Em mulheres, a incidência de fraturas do quadril começa a aumentar por volta dos 65 anos de idade e cresce exponencialmente. Em homens, a incidência de fraturas do quadril começa a aumentar em torno dos 70 anos de idade. Em populações ocidentais a taxa de incidência aumenta exponencialmente com a idade, variando de 2 fraturas por 100 mil pessoas ao ano em mulheres abaixo de 35 anos, até 3032 fraturas por 100 mil pessoas ao ano em mulheres acima de 85 anos. E nos homens, essa taxa aumenta respectivamente de 4 a 1909 fraturas de quadril por 100 mil homens ao ano, respectivamente (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992).

Como marcador de risco para futuras fraturas, um indivíduo portador de fratura de quadril, apresenta um RR de 2.5 para fraturas vertebrais e de 2.3 para uma nova fratura de quadril (KLOTZBUECHER et al., 2000).

Há uma variação nas taxas de fraturas entre as populações. Em geral, indivíduos que moram mais distantes da linha do Equador apresentam uma incidência maior de fraturas. Essas taxas são maiores em indivíduos caucasianos que moram no extremo norte europeu, especialmente em países escandinavos. Locais onde a taxa de incidência solar é mais baixa com, possível, diminuição da produção de vitamina D (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992; MELTON, 1996; RAY et al., 1997).

As taxas são intermediárias em populações orientais e menores em populações negras. A menor taxa de incidência nos países em desenvolvimentos pode ser justificada pela baixa expectativa de vida, mas também por fatores genéticos associados com a qualidade óssea, pois uma fratura de quadril é uma resultante de fatores como baixa massa óssea, baixa qualidade óssea, elevado risco de fratura, comorbidades e idade avançada (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992; MELTON, 1996; RAY et al., 1997).

Essas fraturas apresentam as piores consequências mais desastrosas em termo de desabilidade, mortalidade e hospitalização. Suas consequências incluem desde restrições funcionais da articulação do quadril, com imobilização do paciente até complicações

hospitalares e problemas com a prótese, como falha na fixação do implante ou infecções (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992; MELTON, 1996; RAY et al., 1997).

2.5.4 FRATURAS DE PUNHO

As fraturas de punho apresentam um padrão diferente de ocorrência. Existe um aumento de sua incidência no período peri-menopáusico entre as mulheres, com uma subsequente estabilidade. Isso se justifica pelo fato de que as mulheres mais velhas caem para trás ou para o lado, enquanto que as mulheres mais jovens caem com as mãos estendidas para à frente, devido a alterações na coordenação neuromuscular (Figura 13). Nos homens não há um aumento significativo na incidência dessas fraturas com o avançar da idade (KHAN et al., 2001; CUDDIHY et al., 2002).



Figura 13. Fraturas do punho. As fraturas de punho ocorrem entre mulheres mais jovens e podem gerar alterações permanentes na articulação do punho (Fonte: disponível em <<http://www.doctorshangout.com/profile/akhilareddyg>>).

Em mulheres, a incidência de fraturas do antebraço começa a aumentar em torno dos 45 – 50 anos de idade e diminui em torno dos 65 anos. Não há aumento da taxa de fraturas do antebraço em homens. As fraturas do punho representam o terceiro tipo de fratura osteoporótica mais comum, com aproximadamente 250 mil ocorrências ao ano (KHAN et al., 2001; CUDDIHY et al., 2002).

Como marcador de futuras fraturas, um indivíduo portador de fratura de punho apresenta um RR de 3.3 para fraturas de antebraço, um RR de 1.9 para fratura do quadril

e um RR de 1.7 para fratura vertebral (KLOTZBUECHER et al., 2000).

Após essas fraturas, existe um percentual persistente de dor entre 29 a 44% e de fraqueza entre 36 a 40% dos pacientes. A algoneurodistrofia é uma consequência frequentemente relatada, com sintomas persistentes até 10 anos após a fratura. As fraturas de punho não se associam com a redução da sobrevida. Após 7 anos de sua ocorrência, muitas mulheres referem dificuldade para se vestir, cozinhar, realizar compras, entrar e sair do carro ou utilizar escadas (KHAN et al., 2001; CUDDIHY et al., 2002).

A figura 14 apresenta a incidência das principais fraturas osteoporóticas.

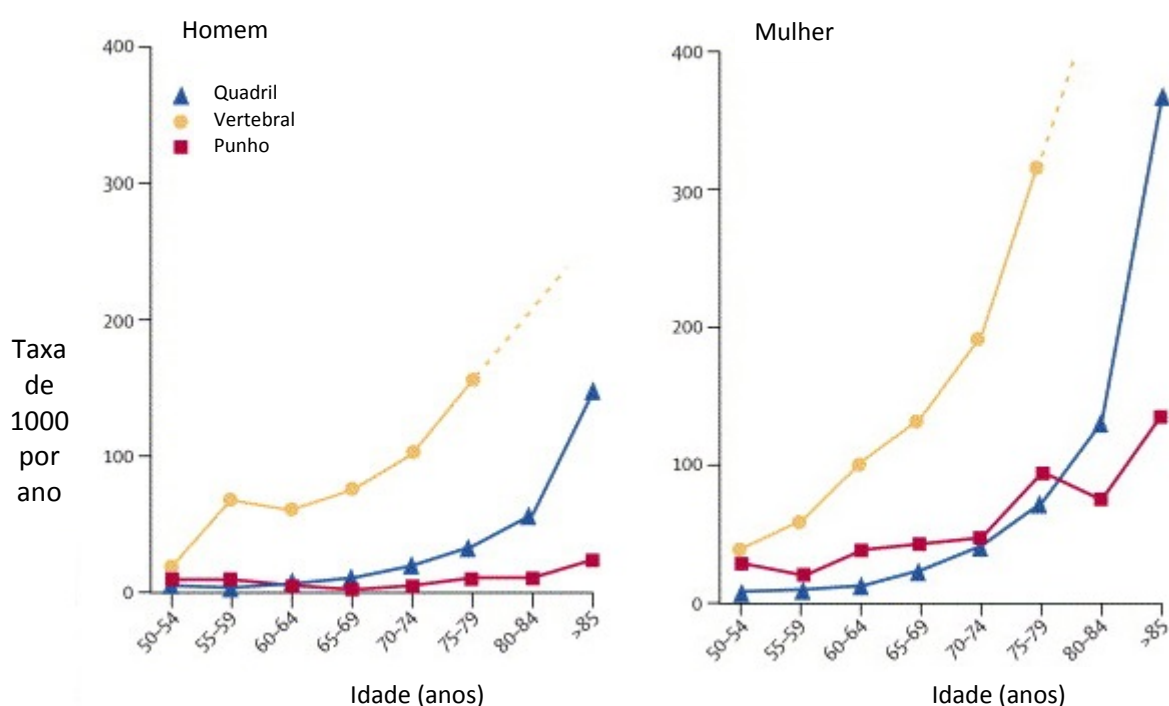


Figura 14. Incidência das fraturas osteoporóticas de quadril, vertebral e de punho. As fraturas por fragilidade ou osteoporóticas são mais comuns em mulheres que em homens e as mais graves como as do quadril acometem indivíduos mais idosos (Fonte: adaptada de European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group, 2002).

2.5.5 FRATURAS NÃO-VERTEBRAIS

A taxa de incidência de fraturas de úmero, pelve e tíbia proximal aumentam

gradativamente com a idade e são maiores em mulheres do que em homens. Essas fraturas também são consideradas de fragilidade por ocorrer em mulheres que apresentam perda de altura, baixa DMO e a baixa qualidade óssea (COOPER et al., 1993).

2.6 FRAX

Os mais frequentes riscos de fraturas relacionadas aos ossos, em nível populacional, estão integrados em um algoritmo chamado FRAX. Nele, estão inclusos a idade, história prévia de fratura, perda de peso, tabagismo atual, ingestão excessiva de álcool, história familiar de fratura, imobilidade, presença de artrite reumatoide, uso de glicocorticoides e osteoporose secundária (KANIS et al., 2011).

Baseado nesses fatores de risco clínico e na DMO, o FRAX avalia o risco individual de fraturas do quadril em 10 anos. Encontra-se disponível online www.shef.ac.uk/FRAX/ e deve ser incorporado na prática clínica. Entretanto, os fatores de risco relacionados à queda foram excluídos desse cálculo, apesar de serem reconhecidamente fatores de risco de fratura, independente da massa óssea e relacionados a fraturas vertebrais e de quadril (KANIS et al., 2011).

2.7 FATORES DE RISCO RELACIONADOS A QUEDAS

No Quadro 2 estão descritos os principais fatores de risco para quedas, os quais se relacionam com alto risco de fraturas independentemente dos fatores relacionados à massa óssea. Entretanto, modificações dos fatores relacionados a quedas têm sido difíceis de serem implementados e existem poucas evidências de que intervenções específicas diminuam o risco de fraturas (Barker, 2009).

Quadro 2. Fatores de risco para quedas em idosos (Barker, 2009).

Fatores	Problemas gerais	Problemas específicos
Fatores Intrínsecos	Deterioração relacionada à idade	Diminuição do controle postural, propriocepção deficiente, fraqueza de membros inferiores, diminuição do tempo de resposta, redução da velocidade de caminhada e comorbidades diversas.
	Alterações do equilíbrio, mobilidade e marcha	Doenças articulares, doença cerebrovascular, neuropatia periférica, doença de Parkinson, alcoolismo e deficiência de vitamina D.
	Alterações visuais	Diminuição da acuidade visual, catarata, glaucoma, degeneração da retina.
	Alterações cognitivas ou depressão	Doença de Alzheimer e doenças cerebrovasculares.
	Perda temporária da consciência	Hipoglicemia, hipotensão postural, arritmia cardíaca, ataque isquêmico transitório, epilepsia.
Fatores Extrínsecos	Riscos pessoais	Uso de roupas e sapatos inapropriados.
	Polimedicções	Sedativos, drogas hipotensivas e glicocorticoides.
Fatores Ambientais	Riscos domésticos	Iluminação deficiente, degraus altos, ausência de corrimão em escadas, pisos molhados, tropeço em brinquedos e em animais, superfícies irregulares e ausência de barras de segurança nos banheiros.

2.8 VITAMINA D

Durante a exposição à radiação solar ultravioleta B (comprimento de onda 290-315 nm UVB), o 7-desidrocolesterol é convertido na pele em pré-vitamina D₃, a qual é imediatamente convertida em vitamina D₃, em um processo dependente do calor. A exposição excessiva à luz solar degrada essas duas formas em produtos inativos. A vitamina D₂ e a vitamina D₃ obtidas de fontes dietéticas são incorporadas aos quilomicrons e transportadas pelo sistema linfático à circulação. A vitamina D (seja a D₂ ou a D₃) metabolizada na pele ou ingerida na dieta pode ser armazenada nos adipócitos e posteriormente liberada na circulação (HOLICK; GARABEDIAN, 2006; HOLICK, 2006-A; HOLICK, 2007).

A Vitamina D circulante está ligada à proteína de ligação da vitamina D, a qual a transporta até o fígado, local onde a vitamina D sofre a primeira hidroxilação, sendo convertida através da enzima 25-hidroxilase-vitamina D em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D]. Esta é a principal forma circulante de vitamina D e é a utilizada para determinar o seu status no organismo (Figura 15). O produto 25(OH)D é então unido a uma proteína transportadora que tem alta afinidade e especificidade por esse metabólito, a transcalfiferina - uma alfa globulina que também é sintetizada pelo fígado - e a transporta até os rins. A 25(OH)D é biologicamente inativa e deve ser convertida pela enzima 1 α -hidroxilase-25-hidroxivitamina D renal (1-OHase) em sua forma ativa - 1,25-di-hidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; HOLICK, 2006-A; HOLICK, 2007).

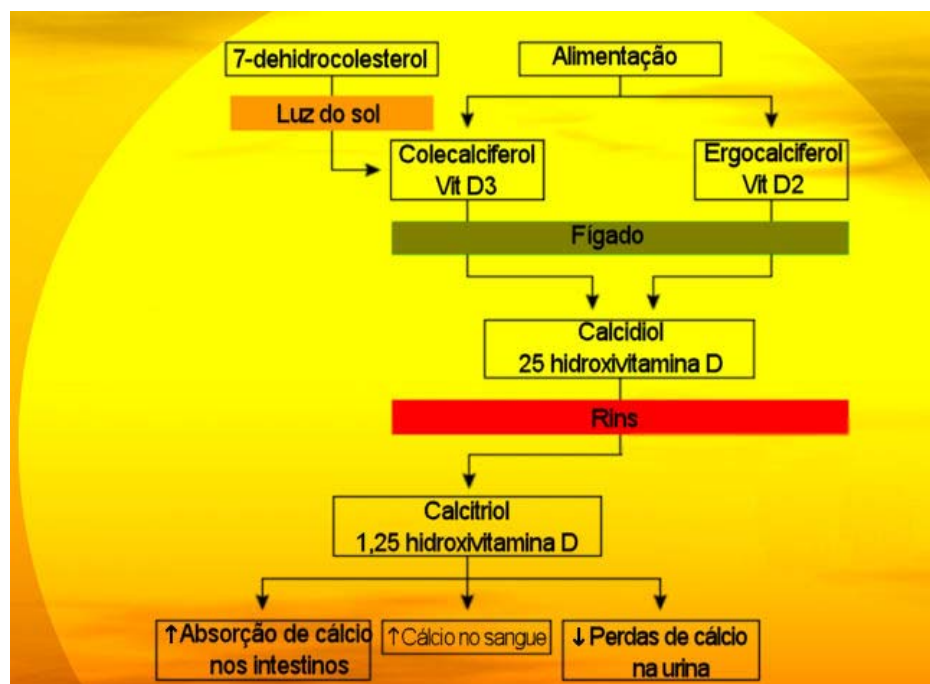


Figura 15. Vias de metabolismo da vitamina D. A vitamina D₂ proveniente da alimentação e a vitamina D₃ proveniente também da alimentação ou da fonte solar sobre o colesterol são transformadas em calcidiol no fígado e posteriormente no metabólito ativo - o calcitriol - nos rins (Fonte:

disponível em [http://www.mdsaude.com/2013/01/vitaminatml?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+mdsaude+\(MD.Saude\)\)](http://www.mdsaude.com/2013/01/vitaminatml?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+mdsaude+(MD.Saude)))).

Uma classificação referente aos níveis plasmáticos da 25(OH)D, uma vez que esta é a forma que se relaciona com a reserva corporal de vitamina D, é a seguinte: suficiência (30 - 100 ng/dl), insuficiência (entre 20 e 30 ng/dl) e deficiência (abaixo 20 ng/dl) (HOLICK, 2007; HOLICK, et al., 2011)

A hipovitaminose D é constatada com detecção de níveis séricos de 25(OH)D abaixo do limiar considerado suficiente para a manutenção da secreção regular do paratormônio (PTH). Isto se aplica especialmente ao idoso, que parece necessitar de concentrações de 25(OH)D mais elevadas para manter níveis normais de PTH. Na insuficiência, evidenciam-se elevações nas concentrações de PTH circulantes traduzindo um hiperparatirismo secundário, configurando numa maior predisposição à baixa DMO e às fraturas (McKENNA; FREANEY, 1998; LIPS, 2001; DELUCA, 2004; BAKHTIYAROVA, et al., 2006; BISCHOFF-FERRARI, et al., 2006; HOLICK, 2006).

Os níveis séricos de fósforo, cálcio, os de fator de crescimento dos fibroblastos 23 (FGF-23) e outros fatores podem aumentar ou diminuir a produção renal de 1,25(OH)₂D (HOLICK; GARABEDIAN, 2006; HOLICK, 2007).

A 1,25(OH)₂D diminui a sua própria síntese através de um feedback negativo sobre a enzima renal, bem como diminui a síntese e secreção do PTH pelas glândulas paratireoides. Além disso, ela pode aumentar a expressão de outra enzima a 24-hidroxilase-25-hidroxivitamina D (24-OHase) a qual a converte em ácido calcitroico, um produto biologicamente inativo e solúvel em água que é excretado através da bile (BISCHOFF-FERRARI, et al., 2006; HOLICK; GARABEDIAN, 2006; HOLICK, 2006-B; HOLICK, 2007).

A 1,25-di-hidroxivitamina D aumenta a absorção intestinal de cálcio através da interação com o complexo de receptores da vitamina D com o receptor X do ácido retinoico (RXR-VDR). Esse complexo de receptores ativado aumenta a expressão dos canais de cálcio epiteliais nas células intestinais (HEANET, et al., 2003; DAWSON-HUGHES, et al., 2005).

A forma ativa da vitamina D possui receptores em células ósseas formadoras de osso - os osteoblastos. A sua interação com esses receptores produz aumento na produção do ligante do fator ativador do receptor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) por essas células. O RANKL liga-se ao seu receptor RANK presente em células pré-osteoclásticas e em osteoclastos maduros induzindo à diferenciação e à ativação dessas células levando a um aumento da reabsorção óssea e contribuindo para a homeostase de cálcio e do fósforo no sangue (DELUCA, 2004; HOLICK, 2006-A).

Sem a ação da vitamina D, apenas 10 a 15% de cálcio e cerca de 60% do fósforo seriam absorvidos. A interação da 1,25-di-hidroxivitamina D com o seu receptor aumenta a eficiência da absorção intestinal de cálcio em 30 a 40% e a da absorção do fósforo em cerca de 80% (GRUDTNER; WEINGRILL; FERNANDES, 1997; PETTIFOR, 2005).

Como o trato digestivo é a via de maior absorção de nutrientes, alterações no metabolismo mineral e, por consequência, no metabolismo ósseo, ocorrem em indivíduos com doenças gastrintestinais desabsortivas, inflamatórias e nos portadores de “by pass”

cirúrgico (GRUDTNER; WEINGRILL; FERNANDES, 1997; MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004; PREMAOR; FURLANETTO, 2006).

Em alguns estudos, os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D acima de 30 ng/ml foram associados com a DMO normal em homens e mulheres. Porém quando esses valores caíam abaixo de 30 ng/ml, havia uma diminuição significativa na absorção intestinal de cálcio, fato que se associou ao um aumento do PTH (McKENNA; FREANEY, 1998; LIPS, 2001; DELUCA, 2004).

O PTH aumenta a reabsorção tubular de cálcio e estimula os rins a produzirem 1,25-di-hidroxivitamina D. O Paratormônio também ativa os osteoblastos, os quais estimulam a transformação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros os quais dissolvem a matriz óssea, causando osteopenia e osteoporose com aumento no risco de fraturas (McKENNA; FREANEY, 1998; LIPS, 2001; DELUCA, 2004).

Sem um produto cálcio fósforo adequado, a mineralização da matriz de colágeno é prejudicada, levando a sinais clássicos de raquitismo em crianças e de osteomalácia em adultos (HOLICK, 2007).

Um estudo mostrou que 93% de indivíduos entre 10 e 65 anos de idade que foram internados em hospitais com dores musculares, dores ósseas e que tiveram diagnósticos de fibromialgia, síndrome da fadiga crônica e até depressão eram deficientes em vitamina D (MALABANAN; TURNER; HOLICK, 1998; PLOTNIKOFF, 2003).

Na célula muscular esquelética, a vitamina D atua através de um mecanismo clássico de ligação a um receptor nuclear e de ligação a um receptor de membrana. Realiza ações que envolvem o transporte de cálcio, a síntese proteica e a velocidade de contração muscular. Há várias evidências de que a vitamina D participa de dois aspectos importantes da função neuromuscular, isto é, a força muscular e o equilíbrio (ZIAMBRAS; DAGOGO-JACK, 1997; PEDROSA; CASTRO, 2005; HOLICK, et al., 2005; BOONEN, et al., 2006).

A cinética da contração muscular repercute na capacidade de realizar movimentos rápidos que evitam quedas. Daí indivíduos com hipovitaminose D estão mais sujeitos a queda e, caso essas pessoas apresentem baixa DMO, o risco de fratura nesse grupo será

ainda mais elevado (LARSEN; MOSEKILDE; FOLSPANG, 2004; HOLICK, et al., 2005; BOONEN, et al., 2006).

A velocidade de desempenho e a de resposta da força muscular foram significativamente melhoradas quando os níveis de 25-hidroxivitamina D aumentou de 4 a 16 ng/ml e continuou a melhorar à medida que aumentaram acima de 40 ng/ml (CHAPUY, et al., 1992; ZIAMBRAS; DAGOGO-JACK, 1997).

Uma meta-análise de cinco ensaios clínicos randomizados (com um total de 1.237 indivíduos) revelou que o aumento da ingestão de vitamina D reduz o risco de quedas em 22% em comparação com cálcio ou placebo. Outra meta-análise também avaliou a frequência de quedas e sugeriu que 400 UI de vitamina D /dia não foi eficaz na prevenção deste evento, enquanto que 800 UI de vitamina D / dia, foi capaz de diminuir este risco. Em outro estudo randomizado controlado realizado por um período de cinco meses com moradores de asilos que receberam 800 UI de vitamina D/dia mais cálcio tinham uma redução de 72% no risco de quedas em comparação com o grupo placebo (BANDEIRA, et al., 2006; BROE, et al., 2007).

O efeito biológico do 1,25-(OH)₂D é desencadeado a partir da conexão com os seus receptores celulares (Receptor da vitamina D – VDR) (HOLICK, 2007; HOLICK, et al., 2011).

A concentração dos VDR's diminui com o avanço da idade, e é uma das causas de resistência à ação do 1,25-(OH)₂D no idoso, com consequente, diminuição da absorção de cálcio, diminuição da DMO e predisposição a quedas e consequentemente um risco elevado para fraturas (VELDMAN; CANTORNA; DELUCA, 2000; RAIMONDI, et al., 2009).

O estrógeno tem uma atividade indutora da síntese desses receptores. A densidade óssea decresce dos níveis considerados normais em torno dos trinta anos em ambos os sexos, enquanto que a taxa de perda óssea torna-se acelerada no sexo feminino após a menopausa, de forma que algumas mulheres perdem massa óssea mais rapidamente, podendo atingir níveis osteoporóticos. A deficiência de vitamina D pode exacerbar a perda óssea na osteoporose e deve ser considerada na sua avaliação, pois a presença de hipovitaminose D tem sido observada com grande frequência, mesmo em regiões de baixa latitude (HOLICK, et al., 2005; BANDEIRA, et al., 2006).

2.9 GENÉTICA DA OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença multifatorial complexa com reconhecido componente genético associado (POCOCK et al., 1987; EISMAN, 1999; RALSTON; CROMBRUGGHE, 2006).

A importância dos fatores genéticos na regulação da susceptibilidade à doença é reconhecida em estudos epidemiológicos e em análises familiares que demonstram que uma história familiar para fraturas (especialmente de quadril) é um forte fator de risco para baixa DMO e futuras fraturas (SEEMAN et al., 1989; SOROKO et al., 1994; CUMMINGS et al., 1995).

Estudos com gêmeos também demonstraram que tanto a DMO da coluna lombar e do colo femural são mais semelhantes em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos (SEEMAN et al., 1989; SLEMENDA et al., 1991). Em geral, esses estudos demonstraram que 50-80% dos parâmetros fenotípicos do osso relacionados com a idade podem ser geneticamente determinados (SEEMAN et al., 1989).

Em casos raros, a osteoporose e a baixa DMO estão associadas com um padrão de herança mendeliana como as síndromes osteoporóticas familiares, devido a mutações no gene da aromatase (CYP19A1), no gene que codifica o receptor de estrogênio (ESR1) ou nos genes LRP5 ou LRP6 (SMITH et al., 1994; MORISHIMA et al. 1995; GONG et al., 2001; MANI et al., 2007). Famílias com alta massa óssea também são descritas com um traço autossômico dominante devido a mutações da LRP5 (KOAY; BROWN, 2005).

A osteogenesis imperfecta, uma doença de caráter hereditário do tecido conjuntivo provocado por mutações nos genes do colágeno tipo 1 $\alpha 1$ (COL1A1) ou $\alpha 2$ (COL1A2) leva à diminuição da força óssea com deformidades esqueléticas e aumento do risco de fraturas (BYERS, 1991). No entanto, com exceção destas raras condições, a osteoporose é considerada uma doença multifatorial, poligênica, na qual múltiplos determinantes genéticos são modulados por fatores hormonais, ambientais e nutricionais (EISMAN, 1999).

Existem muitos genes candidatos relacionados com a determinação da DMO e com a patogênese da osteoporose. Possivelmente, o mesmo fenótipo osteoporótico pode ser o

resultado de diferentes interações genéticas e/ou ambientais. Também é possível que alguns indivíduos, possuindo um ou mais alelos com predisposição genética para o desenvolvimento da doença nunca se tornem osteoporóticos, devido a uma penetrância incompleta desses genes. Por outro lado, indivíduos sem predisponentes alélicos podem desenvolver a doença osteoporótica com a idade devido a fatores não genéticos. A este fato chamamos de fenocópia, ou seja, quando um fenótipo, produzido pelo ambiente, simula o efeito de uma mutação conhecida (GENNARI, 2002).

O controle genético da resistência óssea pode diferir entre os locais do esqueleto, entre os sexos e as etnias. Contudo, não se pode excluir que uma parte significativa da massa óssea está relacionada com contribuições genéticas (HUANG; RECKER; DENG, 2003; PEACOCK et al., 2005).

Nos últimos 20 anos, pesquisadores procuram encontrar genes que influenciassem no risco de desenvolver osteoporose ou no risco de surgimento de fraturas. Os estudos de ligação e os de associação genética foram as duas principais abordagens utilizadas. Na maioria deles, a DMO representou um importante fenótipo, porque, além de apresentar uma alta hereditariedade, também é um importante preditor de risco de fratura com mensuração clínica (NEWTON-CHEH; HIRSCHHORN, 2005).

Na análise de ligação é avaliado um conjunto de centenas a milhares de marcadores espaçados por milhões de bases em todo o genoma em famílias com DMO mensurada. Os marcadores que se segregaram com uma baixa DMO em parentes, mais frequentemente do que o esperado, foram utilizados para localizar os genes da doença. Esta análise tem a vantagem de ser imparcial e realizar uma pesquisa de todo o genoma para susceptibilidade alélica, e tem sido aplicada com sucesso para localizar genes de múltiplas patologias provocadas por alterações de um único gene. No entanto, a análise de ligação não tem sido bem sucedida para doenças poligênicas, talvez, em parte, devido a uma capacidade limitada de detectar a ação de alelos comuns com efeitos pequenos sobre a patologia (NEWTON-CHEH; HIRSCHHORN, 2005).

Até o momento, mais de dez estudos de ligação, alguns cobrindo todo o genoma e outros apenas um intervalo menor, foram realizados em várias populações com um número de regiões cromossômicas demonstrando evidências sugestivas de ligação.

Entretanto, apenas algumas regiões têm demonstrado evidências significativas com replicações dos resultados em outras populações (RALSTON; CROMBRUGGHE, 2006; LEE et al., 2006). Mesmo que não haja um consenso entre um loci controlador das características relacionadas à DMO e à osteoporose, estes estudos sugerem que os genes que regulam a massa óssea podem atuar em determinado sítio esquelético de forma específica de acordo com a idade e o sexo (RALSTON; CROMBRUGGHE, 2006).

Os estudos de associação são amplamente utilizados no campo da genética da osteoporose. Neles, variantes polimórficas são correlacionadas com a DMO em populações ao invés de famílias. Por esta abordagem, um grande número de polimorfismos em diferentes genes tem sido relacionado com a regulação da massa óssea e a ocorrência de osteoporose ou fraturas por fragilidade. (EISMAN, 1999; GENNARI et al., 2002; LIU et al., 2003 RALSTON; CROMBRUGGHE, 2006). Entre eles, os mais estudados incluem polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (VDR), do gene ESR1, do gene COL1A1, do gene LRP5 e do gene CYP19A1, os quais têm sido associados com DMO e osteoporose em diferentes populações (HIRSCHHORN; DALY, 2005; ALBAGA; RALSTON, 2006).

Com o avanço de tecnologias em biologia molecular tornou-se possível a avaliação de todo o genoma para fatores de risco genético comuns em grandes grupos de pacientes. (KIEL et al., 2007; HIRSCHHORN; GENNARI, 2008). Tais estudos de associação do genoma permitem uma melhor abordagem para avaliar doenças complexas como a osteoporose. Uma investigação preliminar do genoma de 1.141 indivíduos do estudo de Framingham identificou 40 SNPs potencialmente associados a vários fenótipos ósseos, embora os resultados não atendessem o limiar estatístico (RICHARDS, 2008).

Duas grandes coortes, uma na população islandesa e outra no Reino Unido, identificaram evidências de associação entre a DMO e SNPs dos genes OPG, LRP5, ESR1, RANKL e em uma região não codificada dos genes ZBTB40 e WNT4 da via Wnt (RICHARDS, 2008; STYRKARSDOTTIR et al., 2008). Destes genes, apenas o SNP rs4355801 do gene da OPG foi comum nos dois estudos. Posteriormente, uma coorte do Reino Unido e um estudo transversal chinês também verificaram a associação desse polimorfismo da OPG com baixa massa óssea e osteoporose (PATERNOSTER, L. et al.,

2010; SHANG, M., LIN, L., CUI, H, 2013). Recentemente um estudo na população mexicana também encontrou associação entre o SNP rs3736228 da LPR5 e o risco de baixa massa óssea tal qual a investigação realizada por RICHARDS et al. em 2008 (FALCÓN-RAMÍREZ, 2013).

Algumas das associações relatadas entre o ESR1, OPG, RANKL e LRP5 envolvem importantes vias reguladoras da homeostase óssea, como o estrogênio, o sistema OPG-RANK-RANKL e o sistema Wnt. No entanto, todas estas variantes genéticas explicam apenas pequenas alterações na DMO (RICHARDS, 2008; STYRKARSDOTTIR et al., 2008).

2.10 Polimorfismo do gene VDR e osteoporose

Devido à importância da vitamina D na fisiologia óssea, variantes alélicas comuns do gene do VDR foram os primeiros polimorfismos a serem investigados para uma possível associação entre a remodelação óssea, a DMO e o risco de desenvolver osteoporose (MORRISON et al., 1992; MORRISON et al., 1994).

O gene VDR humano localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q13.11) e é composto por nove exons, sendo o primeiro deles não transcrito, e oito íntrons (HAUSSLER et al., 1998; JURUTKA et al., 2001). Os oito exons codificantes são transcritos para o RNA mensageiro, que por sua vez é convertido a uma proteína funcional VDR. O gene possui mais de 100 kb, apresenta uma região promotora capaz de gerar múltiplas transcrições específicas de tecidos e fica localizado próximo ao gene que codifica o colágeno tipo II- α 1 (UITTERLINDEN et al., 2004).

De acordo com o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia dos Estados Unidos (NCBI) mais de 180 polimorfismos foram identificados no locus do gene VDR humano. Os polimorfismos mais estudados estão descritos na Figura 16.

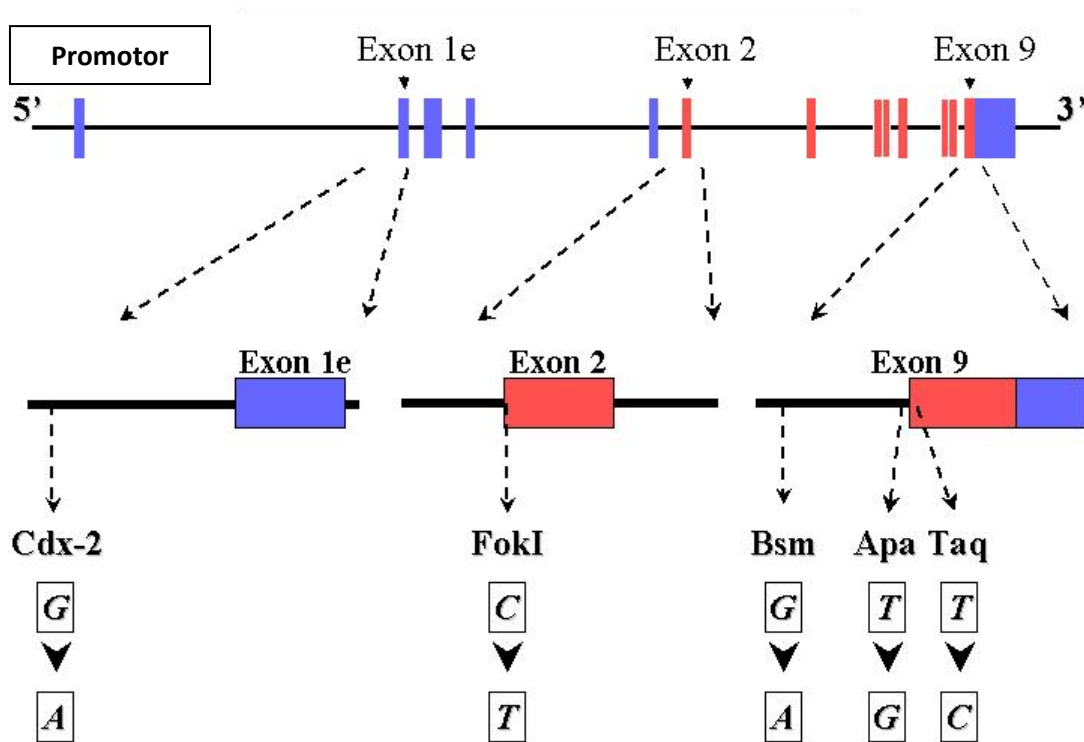


Figura 16. Polimorfismos do gene codificante do VDR. O polimorfismo *Cdx-2* está localizado na região promotora do gene VDR, com o alelo A fornecendo uma maior atividade transcricional ao gene. O *FokI* está localizado na região codificante e tem um efeito sobre a atividade do receptor. Os polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *TaqI* estão localizados na extremidade 3'UTR do gene. (Fonte: disponível em <http://www.genomos.eu/index.php?page=history>).

Em 1992, Morrison et al., utilizou pela primeira vez um gene candidato para relacionar variantes alélicas, devido a polimorfismos na região 3'-UTR do gene VDR com o “turnover” ósseo. Nessa população australiana, os polimorfismos identificados pelas enzimas *BsmI* (Rs1544410, IVS8 284 A>G) e *ApaI* (Rs17879735, IVS8-48 T>G) foram preditores de variação nos níveis dos marcadores do remodelamento ósseo, como a osteocalcina sérica, proteína secretada pelos osteoblastos com influência positiva sobre a mineralização da matriz óssea. Os níveis de osteocalcina do grupo BB do *BsmI* foram significativamente maiores que os do grupo bb ($p=0,0001$). Da mesma forma, os alelos AA

versus aa para o *Apal* também apresentaram maiores níveis de osteocalcina ($p=0,001$). Após esta publicação, outros estudos foram realizados avaliando a associação entre estes e outros SNPs do gene VDR com DMO de mulheres pré e pós-menopausadas de origem caucasiana, asiática e africana demonstrando resultados diferentes em relação ao estudo de MORRISON et al (1992). Nesses novos estudos os genótipos bb e aa foram relacionados com baixa massa óssea ou osteoporose e alguns descrevem o genótipo bb como protetor para fraturas osteoporóticas (EISMAN, 1999; HUANG; RECKER; DENG, 2003; NEWTON-CHEH; HIRSCHHORN, 2005; ZMUDA; KAMMERER, 2008).

Em uma meta-análise foi avaliada uma possível relação entre os polimorfismos *BsmI*, *TaqI*, *Apal* e *FokI* do gene VDR e o risco de fratura. Os resultados com base nos estudos mostraram que todos os casos de fratura teve uma frequência significativamente menor do genótipo bb de *BsmI* (OR = 0,87, IC 95% 0,76 - 0,98), sugerindo uma proteção nesses portadores. Na avaliação por tipo de fratura evidenciou-se que as fraturas de quadril tiveram uma frequência significativamente menor no genótipo bb do *BsmI* (OR = 0,82, IC 95% 0,70 - 0,97); uma frequência significativamente menor no genótipo Tt do *TaqI* (OR = 0,65, IC 95% 0,43, 0,97) e uma frequência maior no genótipo TT de *TaqI* (OR = 1,74, IC 95% 1,05, 2,91). As fraturas vertebrais apresentaram maior frequência no genótipo Aa do *Apal* (OR = 1,63, IC 95% 1,03 - 2,59). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos genótipos do *FokI* em relação às fraturas (JI, et al., 2010).

Porém um estudo com 501 mulheres polonesas pós-menopausadas, foi observada uma incidência de fraturas não-vertebrais significativamente maior nos portadores de alelos “a” do *Apal*, “b” de *BsmI* e “T” de *TaqI* dos polimorfismos do gene VDR ($p = 0,021$; 0,032; 0,020 respectivamente). Por outro lado, não foram encontradas associações significativas entre as variantes alélicas dos polimorfismos estudados e DMO (HORST-SIKORSKA et al., 2013).

Enquanto não se evidenciou diferença entre as frequências dos polimorfismos *BsmI*, *FokI*, *Apal* e *TaqI* do gene VDR entre os grupos formados por 130 mulheres pós-menopausadas e 130 controles turcos no menacme e a DMO de coluna lombar e quadril (Yoldemir et al., 2011), foi encontrada associação entre os polimorfismos *BsmI* e a DMO de colo femural ($p = 0.037$) e entre *Apal* com a DMO de coluna lombar ($p=0.012$) em uma

meta-análise com mulheres pós-menopausadas chinesas (LI et al., 2012).

Da mesma forma, em um estudo com 146 mulheres iranianas pré e pós-menopausadas encontrou-se associação significativa entre o genótipo GG do polimorfismo da *BsmI* do gene VDR e aumento da DMO de coluna lombar no grupo de mulheres pré-menopausadas ($p < 0.05$). Neste estudo, as frequências de AA e GG foram significativamente diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$), com o primeiro genótipo sendo mais frequente nos pacientes e o segundo mais frequente no grupo normal (POURESMAEILI et al., 2013).

Em uma meta-análise foi encontrado um padrão de proteção contra o desenvolvimento de osteoporose: o genótipo bb do *BsmI* foi associado com uma redução significativa do risco de osteoporose em comparação geral: genótipo bb vs BB (OR = 0,61), genótipo bb vs BB/Bb (OR = 0,70), respectivamente. Nas análises de subgrupo foi demonstrado que o genótipo bb teve uma diminuição do risco de desenvolvimento de osteoporose em mulheres europeias na pós-menopausa no genótipo BB vs BB/Bb (OR = 0,68) e em africanas no genótipo Bb/bb vs BB (OR = 0,18) (JIA et al., 2013).

Um polimorfismo adicional (rs178819664, C>T) reconhecido pela endonuclease de restrição *FokI* no exon 2 do gene VDR foi associado com diferenças na DMO. Em um estudo com mulheres pós-menopausadas americanas de descendência mexicana o polimorfismo *FokI* do gene VDR correlacionou-se com a diminuição da DMO da coluna lombar nos genótipos ff em relação ao FF ($p = 0,01$) e com um aumento da taxa de perda óssea no quadril em indivíduos ff ($p = 0,005$) (GROSS et al., 1996). Este SNP introduz um “splicing” alternativo, que resulta em uma isoforma mais curta do RNAm na presença do alelo C (ARAI et al., 2001).

Em 1997, foi descrito outro polimorfismo funcional (Rs17883968, -3731G>A) na região promotora 1a/1e do gene do VDR em um sítio de ligação para o fator de transcrição *Cdx-2* associado à DMO na população japonesa (ARAI et al., 1997). Porém, contrariamente, em outro estudo com 1.340 mulheres japonesas, não foi observado associação desse polimorfismo com a DMO (MORITA et al., 2005).

Entretanto, em 2003, em um estudo com alemães foi observado um efeito protetor do alelo A sobre a ocorrência de fraturas osteoporóticas, não vertebrais, em mulheres

onde o risco relativo de genótipo AA contra GG foi de 0,2 (FANG et al., 2003). E, recentemente, em um estudo com 229 mulheres pós-menopáusicas espanholas foi avaliado o polimorfismo *Cdx-2* no gene VDR; e, foi constatado que a presença do alelo A foi protetor contra a perda de massa óssea (CASADO-DÍAZ, A. et al., 2013).

Três meta-análises avaliaram resultados de estudos do VDR e confirmaram a contribuição do genótipo *BsmI* na variação da DMO (COOPER; UMBACH, 1996; GONG et al., 1999; THAKKINSTIAN et al., 2004). Por outro lado, em outra meta análise não foi observado relação entre o risco de fratura e este polimorfismo (FANG et al., 2006).

Entretanto, nenhuma associação significativa foi observada entre os polimorfismos *Cdx-2*, *FokI*, *BsmI*, *Apal*, e *TaqI* do VDR e massa óssea, perda de massa óssea ou fratura em uma coorte populacional de 3100 mulheres britânicas (MACDONALD et al., 2006). Em outro estudo multicêntrico europeu os mesmos polimorfismos do VDR foram analisados em 18.405 mulheres e não foi observado associação desses polimorfismos com DMO ou fraturas osteoporóticas. Porém o polimorfismo *Cdx-2* foi associado com diminuição do risco de fraturas vertebrais para os portadores do alelo A ($p=0,039$) (UITTERLINDEN et al., 2006).

Muitos estudos apresentam amostras de tamanho inadequado, com vários fatores conflitantes, como a idade, o status de estrogênio e a etnia, além de diferentes interações ambientais. Isso pode explicar, em parte, os resultados discordantes dos estudos sobre os polimorfismos do gene VDR e sua associação com a DMO e risco de fratura. Além disso, outros polimorfismos de outros genes, como o que codifica o receptor do estrogênio e do colágeno parecem modular os efeitos ósseos das variantes genéticas do VDR (DENG et al., 1998; GENNARI et al., 1998; SUAREZ; ROSSIGNOL; GARABEDIAN, 1998; WILLING et al., 1998; GIGUERE et al., 2000).

Fang et al. (2005) determinaram a variação polimórfica nas regiões mais relevantes do gene VDR, incluindo a construção de blocos em desequilíbrio de ligação e a identificação de blocos de haplótipos (envolvendo *BsmI*, *Apal*, e *TaqI*) em diferentes grupos étnicos. Em caucasianos, sete blocos de haplótipos foram identificados, sendo, quatro blocos na região promotora, um grande bloco incluindo os exons de 4 a 9 e o 3'-UTR. Em asiáticos, quatro blocos de haplótipos foram observados e, entre os americanos

afrodescendentes, oito blocos de haplótipos e sete SNPs não ligados foram encontrados. Os blocos de haplótipos foram analisados em relação à DMO e fraturas em uma coorte de 6148 indivíduos. Os blocos de haplótipos da região promotora 5'1a/1e-1b e da região 3'-UTR do *VDR* foram associados ao aumento do risco de fratura. Indivíduos com genótipos de risco em ambas as regiões (em um total de 16% da população do estudo) tiveram um risco aumentado em 48% para fraturas, independente da idade, sexo e DMO.

Resultados referentes apenas ao bloco haplotípico 3'-UTR foram também encontrados em um estudo posterior com 5014 homens asiáticos caucasianos idosos que tiveram risco aumentado para fraturas (GRUNDBERG, E. et al., 2007).

2.10.1 Farmacogenômica dos polimorfismos do gene do VDR

Embora os SNPs *BsmI*, *FokI*, *Apal* e *TaqI* do *VDR* demonstrem um efeito modesto no risco de fratura e DMO em grandes estudos populacionais e sem efeitos significativos em três estudos de associação genômica (KIEL et al., 2007; RICHARDS et al., 2008; STYRKARSDOTTIR et al., 2008) é possível que os efeitos mais relevantes possam ocorrer em resposta a tratamentos com cálcio, vitamina D ou aos metabólitos ativos destas substâncias.

2.10.1.1 Polimorfismos do gene VDR e ingesta ou suplementação de cálcio

Existem evidências de que a relação entre os genótipos relacionados aos polimorfismos do gene *VDR* e o osso pode ser modificada através da ingesta de cálcio e que variantes alélicas do *VDR* podem prever a resposta à suplementação de cálcio (FERRARI, 1998; FERRARI; BONJOUR; RIZZOLI, 1998; GENNARI, 2002; MORITA et al., 2005; GENNARI et al., 2007). O Quadro 3 apresenta alguns estudos que avaliaram os polimorfismos do *VDR* em populações que utilizavam suplementação de cálcio e vitamina D.

Quadro 3. Resultados dos principais estudos sobre a ingestão de cálcio em relação ao genótipo *VDR*.

Polimorfismo	Indivíduos/País	Características do Estudo	Efeitos	Referências
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	72 idosos (Suíça)	Estudo longitudinal de 1,5 anos com suplementos de cálcio e vitamina D.	Maiores perdas de DMO da coluna lombar em BB do que nos genótipos bb ou Bb	FERRARI et al., 1995
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	229 mulheres na pós-menopausa (EUA)	Avaliação de 2 anos com suplementação de cálcio (500 mg/dia)	Maior resposta para suplementos de cálcio em mulheres com genótipo BB do que outros genótipos	KRALL et al., 1995
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	60 mulheres na pós-menopausa (EUA)	Estudo sobre absorção de cálcio em BB versus bb	Absorção de cálcio reduzida em mulheres BB e não é aumentada com a ingestão de cálcio	DAWSON-HUGHES et al., 1995
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	470 mulheres na pré-menopausa (EUA)	Estudo transversal sobre a ingestão de cálcio e estilo de vida	Associação entre DMO e ingestão de cálcio no BB, mas não no genótipo bb.	SALAMONE et al., 1996
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	328 indivíduos do Estudo de Framingham (EUA)	Estudo transversal com ingestão de cálcio	Associação positiva entre a ingestão de cálcio e DMO apenas no genótipo bb	KIEL et al., 1997
3'-UTR (<i>Bsml</i>)	101 meninas pré-púberes (Suíça)	Estudo randomizado de 1 ano de suplementação com cálcio	Com a suplementação de cálcio, houve aumento da DMO em meninas pré-púberes Bb e BB. Nas meninas bb houve ganho de BMD, porém manteve-se inalterado com a suplementação	FERRARI, 1998
5'-UTR (<i>Cdx-2</i>)	1340 mulheres (15-79 anos) (Japão)	Estudo longitudinal de 3 anos	Associação com alterações da DMO somente em indivíduos com baixa ingestão de leite	MORITA et al., 2005

O fato de que a quantidade de ingestão de cálcio pode alterar a função / atividade do *VDR* com conseqüentes alterações fenotípicas da DMO constitui um fator de confusão nos estudos do polimorfismo do *VDR*, sendo as associações entre os polimorfismos e DMO mais detectáveis em populações com uma baixa ingestão de cálcio (FERRARI et al., 1995; KRALL et al., 1995; SALAMONE et al., 1996; KIEL et al., 1997; FERRARI, 1998; FERRARI; BONJOUR; RIZZOLI, 1998; GENNARI et al., 2007).

Demonstra-se assim, uma variabilidade na resposta do esqueleto na dieta de cálcio, que pode estar relacionada com fatores genéticos. Evidências diretas de uma interação entre o polimorfismo *BsmI* do *VDR* e ingestão de cálcio surgiram primeiramente a partir de uma análise das alterações de DMO em pacientes idosos que recebiam suplementos de cálcio e vitamina D, demonstrando maiores perdas da DMO da coluna lombar em indivíduos com o genótipo BB do que os com genótipos Bb ou bb. (FERRARI et al., 1995)

Um estudo com idosos da coorte de Framingham apresentou resposta diferente de acordo com o genótipo do *VDR* entre o uso ou não de suplementos de cálcio e DMO. A ingestão de cálcio foi melhor correlacionada com alterações da DMO no genótipo bb do que nos outros genótipos (KIEL et al., 1997). Diferentes relatos indicam que interações similares também ocorrem em indivíduos mais jovens. Em um estudo com 470 mulheres na pré-menopausa, os indivíduos com o genótipo bb tiveram a DMO pouco alterada pela variação na ingestão de cálcio, em contraste com aqueles com o genótipo BB, nos quais uma associação positiva foi demonstrada entre a ingestão de cálcio e DMO (SALAMONE et al., 1996).

Em outro estudo randomizado, placebo controlado, com 101 meninas pré-púberes o aumento da ingestão média de cálcio (800-1700 mg/dia) não alterou a DMO em qualquer sítio esquelético nas portadoras do genótipo bb, enquanto aumentou significativamente a massa óssea naquelas com genótipos Bb e BB. Do mesmo modo, um estudo em uma população de origem japonesa demonstrou uma associação entre o polimorfismo do *Cdx-2* do *VDR* e DMO, apenas em indivíduos com baixa ingestão de cálcio e sem nenhuma associação naqueles com alta ingestão (MORITA et al., 2005). Dessa forma, qualquer potencial efeito genotípico sobre a DMO seria em grande parte mascarado em populações

com ingesta de cálcio relativamente alta (Estudo Rotterdam) ou amplificado em pessoas com baixa ingesta de cálcio. Estas observações indicam que o intestino é um local provável de ação das variantes alélicas do *VDR*, com a possibilidade de que diferentes alelos *VDR* podem estar associados com diferentes níveis da absorção intestinal de cálcio. Indivíduos com haplótipos ou alelos *VDR* desfavoráveis podem ter uma absorção de cálcio intestinal diminuída. Esta diferença na eficiência de absorção pode ser atenuada ou mesmo abolida naqueles com alta ingesta de cálcio e vitamina D (SHIEKH et al., 1988). De acordo com esta hipótese, um estudo em mulheres pós-menopáusicas norte-americanas mostrou uma diminuição da absorção de cálcio no grupo indivíduos com genótipo BB em comparação com o genótipo bb, especialmente quando a ingesta diária de cálcio foi menor que 300 mg/dia. Tal diferença na eficiência de absorção de cálcio entre os indivíduos com genótipos opostos BB e bb desapareceu quando as mesmas mulheres receberam uma dieta com alto teor de cálcio (1500 mg/dia) (DAWSON-HUGHES et al., 1995; GENNARI et al., 1997; WISHART et al., 1997; AMES et al., 1999).

Além disso, polimorfismos do *VDR* afetam diretamente a regulação da glândula paratireoide em indivíduos com hiperparatireoidismo primário ou com doença renal em estágio final (CARLING et al., 1995; CARLING et al., 1997; YOKOYAMA et al., 1998) e em mulheres normais na pré-menopausa (McCLURE et al., 1997). Um estudo com homens saudáveis caucasianos que receberam uma ingesta enriquecida com cálcio e fósforo, ou uma dieta restrita destes alimentos, mostrou que indivíduos com o genótipo BB apresentavam uma menor reabsorção tubular de fósforo e um aumento dos níveis PTH, particularmente no grupo com dieta restrita a despeito dos níveis similares de vitamina D (FERRARI et al., 1999). Tomados em conjunto, estas observações sugerem que variantes alélicas do *VDR* podem assumir um papel maior quando existe um maior consumo de cálcio, como nas fases de crescimento puberal e senescência. No entanto, estas hipóteses ainda precisam ser confirmadas em estudos longitudinais de grande escala, bem como em populações de alto risco, como indivíduos pouco expostos à luz solar, com baixos níveis de vitamina D ou com baixa ingesta de cálcio. Além disso, a combinação de haplótipos ao invés de polimorfismos simples é necessária à análise do papel das variantes genéticas do *VDR* na suplementação de cálcio (STATHOPOULOU, M.G., et al., 2010).

2.10.1.2 Polimorfismos do gene VDR e suplementação ou tratamento com vitamina D

Apesar do grande número de estudos de associação entre risco de fraturas e DMO, poucos estudos têm investigado os efeitos dos polimorfismos do *VDR* no que diz respeito à suplementação ou ao tratamento com a vitamina D (Quadro 4) (YAMAGATA et al., 1994; HOWARD et al., 1995; MATSUYAMA et al., 1995; GRAAFMANS et al., 1997; HUNTER et al., 2000; PALOMBA et al., 2000; MORRISON et al., 2005; MICHAELSSON et al., 2006).

Indivíduos com alta ingesta de vitamina D (> 7,28 mg/dia) tiveram um ganho de 9% em DMO no colo femural e 6% de DMO na coluna lombar, comparados com indivíduos com baixa ingesta de vitamina D (<4,05 mg/dia). No entanto, a ingesta de vitamina D preveniu a perda (em 2 anos) somente em indivíduos homozigotos para a presença de repetições da poliadenosina (Poli A) (> 17 repetições). Nenhum resultado consistente foi observado em homens com baixas repetições de Poli A (<17 repetições). Como os padrões alimentares não são substancialmente alterados em homens adultos, este estudo reflete, possivelmente, a exposição em longo prazo à vitamina D, em contraste com a exposição de curta duração que podem ser obtidos em ensaios clínicos randomizados com suplementação de vitamina D (MICHAELSSON et al., 2006). Até o momento, alguns estudos examinaram o efeito dos genótipos na capacidade de resposta aos tratamentos com vitamina D e seu análogos ativos, embora em pequenas amostras populacionais (HOWARD et al., 1995; GRAAFMANS et al., 1997). Resultados positivos foram observados em estudos japoneses (YAMAGATA et al., 1994). Em outros estudos o genótipo prevalente em grupos asiáticos bb ou aabbTT quando os três RFLPs na região 3'-UTR foram combinados pareceu ser mais sensíveis ao tratamento com alfacalcidol em comparação com heterozigotos ou indivíduos homozigotos para o outro genótipo BB ou AABbt, que não responderam ou até mesmo tiveram uma piora no quadro geral (YAMAGATA et al., 1994; MATSUYAMA et al., 1995).

Quadro 4. Resultados dos principais estudos sobre a ingesta da vitamina D em relação ao genótipo *VDR*

Polimorfismo	Indivíduo/País	Tratamento	Duração	Efeito	Referência
3'-UTR (<i>BsmI</i> , <i>Apal</i> e <i>TaqI</i>)	Mulheres na pós-menopausa (Japão)	Alfacalcidol	1 ano	Maior aumento na DMO no genótipo bb do no BB	YAMAGATA et al., 1994
3'-UTR (<i>BsmI</i> , <i>Apal</i> e <i>TaqI</i>)	21 indivíduos saudáveis (Austrália)	Calcitriol	7 dias	Melhor resposta na supressão do PTH e marcadores de remodelação óssea no genótipo bb versus BB	HOWARD et al., 1995
3'-UTR (<i>BsmI</i> , <i>Apal</i> e <i>TaqI</i>)	115 mulheres na pós- menopausa (Japão)	Alfacalcidol	1 ano	Maior aumento da DMO no haplótipo baT do que BA _t	MATSUYAMA et al., 1995
3'-UTR (<i>BsmI</i> , <i>Apal</i> e <i>TaqI</i>)	81 mulheres na pós- menopausa (Holanda)	Vitamina D 400 UI/dia versus placebo	2 anos	Maior aumento na DMO no BB versus bb tratados, versus placebo	GRAAFMANS et al., 1997

Por outro lado, um estudo com mulheres caucasianas demonstrou um aumento de duas vezes na DMO após 2 anos de tratamento com a vitamina D (400 UI/dia) em indivíduos com o genótipo BB em relação ao bb (GRAAFMANS et al., 1997). Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos do *VDR* em um estudo randomizado com gêmeos utilizando suplementação de vitamina D (800 UI/dia). Nesses 64 pares de gêmeos, com uma média de ingesta de cálcio superior a 1000 mg/dia houve uma tendência a um efeito positivo do tratamento nos indivíduos com o genótipo TT (HUNTER et al., 2000).

Diferenças nas formulações de vitamina D ou ingesta de cálcio entre estudos com indivíduos caucasianos e asiáticos poderiam justificar estes contrastes. Em um estudo de 3 anos comparando calcitriol com cálcio para prevenção de fraturas vertebrais foi demonstrado que a suplementação de cálcio (1 g/dia) foi igualmente efetiva ao calcitriol mais cálcio nos indivíduos com o genótipo TT (ou bb), enquanto que os indivíduos com os genótipos Tt (Bb) ou tt (BB) tiveram aumento na taxa de fraturas durante o tratamento com cálcio (MORRISON, N.A. et al., 2005).

Em uma análise de 40 mulheres foram encontrados indivíduos com genótipo AAtt, correspondente ao genótipo BB, que tiveram uma maior resposta ao calcitriol, com um aumento de 1,5% na DMO em 1 ano, durante uma maior dieta de ingesta de cálcio, apesar de diferenças semelhantes entre calcitriol e placebo terem sido observadas (GENNARI et al., 2007).

Por outro lado, a baixa ingesta de cálcio em indivíduos com genótipo AAtt apresentou uma perda de 1,5% na DMO, que foi apenas parcialmente atenuada com tratamento pelo calcitriol. Assim, na maioria destes estudos, os genótipos do *VDR* associados com o aumento do risco de osteoporose e fraturas também mostram uma melhor resposta ao tratamento com calcitriol mais cálcio. Possivelmente, uma menor atividade funcional do gene *VDR* nos indivíduos com genótipos ABt podem explicar a maior prevalência de osteoporose nesses indivíduos e também justificar porque portadores desses genótipos se beneficiam da terapia com calcitriol. Esta hipótese é sustentada

pelas diferenças na distribuição dos genótipos entre os diversos grupos étnicos, com aumento da prevalência do alelo b em populações de ascendência asiática, enquanto que o alelo B é mais comum nas populações de ascendência europeia. Tal diferença étnica na distribuição dos genótipos do gene VDR pode explicar em parte a menor resposta aos metabólitos da vitamina D, observada em estudos com caucasianos, em oposição aos estudos com japoneses. Um aumento da prevalência do genótipo bb pode também explicar a menor incidência de fraturas osteoporóticas em populações asiáticas que caucasianas, independente da baixa ingestão do cálcio (inferior a 400 mg/dia) (GENNARI, 2002).

2.10.2 Funcionalidade dos polimorfismos do gene VDR

Até o momento, apesar do grande número de estudos populacionais, a influência dos polimorfismos do gene VDR sobre a função da proteína e a sua sinalização permanecem desconhecidas. A maioria dos polimorfismos estudados está em regiões regulatórias, na região promotora e 5'-UTR ou na região 3'-UTR, e não na região codificante. Dessa forma, é mais provável que as diferenças nos níveis de expressão do *VDR*, tanto quanto os seus efeitos funcionais estejam relacionados com afinidade de ligação ao DNA que pode se associar com estas variantes polimórficas (OHTERA; ISHII; MATSUYAMA, 2001; UITTERLINDEN et al., 2004).

Os polimorfismos na região 3'-UTR do gene VDR não produzem alterações na sequência de aminoácidos da proteína VDR. Morrison et al. (1994) observou atividades diferentes da luciferase no *VDR* com obtenção dos haplótipos ABt e abT. No entanto, a maioria dos estudos posteriores não demonstrou diferença significativa na transcrição específica do alelo, na estabilidade do RNAm ou na capacidade de ligação em relação aos polimorfismos estudados (MOCHARLA et al., 1997; VERBEEK et al., 1997; CARLING et al., 1998; GROSS, 1998; DURRIN et al., 1999; YAMAGATA et al., 1999; COLIN et al., 2000; PALOMBA et al., 2000; OHTERA; ISHII; MATSUYAMA, 2001; UITTERLINDEN et al., 2004).

Uma hipótese é a de que estes polimorfismos podem estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais localizados no gene *VDR* ou com um gene próximo. Uma ligação entre variantes alélicas do 3'-UTR do *VDR* e diferenças no número de repetições da poli (A) do gene *VDR* tem sido descrita (INGLES et al., 1997; HAUSSLER et al., 1998).

A poli-A é uma longa cadeia de nucleotídeos de adenina que é adicionada a um RNA mensageiro (RNAm) durante sua formação a fim de aumentar sua estabilidade. Imediatamente após a transcrição gênica, a nova molécula de RNA sofre várias modificações. Estas modificações alteram as duas extremidades do RNA primário para produzir uma molécula de RNAm “maduro”. O processamento da extremidade 3'-UTR adiciona uma sequência de repetições de adenina à molécula de RNA. Este processo, chamado de poliadenilação, adiciona uma sequência que varia entre 100 até 250 resíduos de comprimento de adenina. O tamanho dessa extensão (determinada pelo número de repetições da poli-A) faz com que a molécula de RNAm seja mais estável, evitando a sua degradação. Além disso, permite que a molécula de RNAm maduro possa ser exportada do núcleo e traduzida em proteína por ribossomos no citoplasma. Os alelos a, b, e T estão relacionados com longos comprimentos de repetição da poli-A, enquanto os alelos A, B e t estão ligados a um comprimento curto da poli-A. Observações experimentais em linhagens de fibroblastos humanas evidenciam um aumento da atividade do *VDR* com sequências longas de repetição da Poli-A (JURUTKA et al., 2001; UITTERLINDEN et al., 2004; FANG et al., 2005). Uma vez que o grau de desequilíbrio de ligação entre as repetições da poli-A e polimorfismo 3'-UTR varia entre diferentes populações esta poderia, em parte representar algumas inconsistências nos estudos de associação do *VDR* (FANG et al., 2005).

O polimorfismo *FokI* na região inicial da tradução no exon 2 do gene *VDR* resulta em três aminoácidos diferentes entre a proteína codificada pelos alelos F e f, fornecendo mecanismos teóricos que comprometem a função do *VDR*. Arai et al., em 1997, primeiramente demonstrou uma forma mais curta do *VDR* com 424 aminoácidos, originado do alelo F, que é 1,7 vezes mais ativa do

que na forma maior com 427 aminoácidos, originado do alelo f. Esta observação foi confirmada por estudo *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico, enquanto em outros estudos com diferentes linhagens celulares, nenhuma diferença funcional foi observada entre os alelos *FokI* (GROSS et al., 1998; CORREA et al., 1999). De interesse particular, também foi demonstrado que a interação entre duas isoformas do receptor *FokI* e a transcrição do fator II B na região N-terminal, o alelo F possui uma maior atividade transcricional, fornecendo aumento para DMO associando-se com os genótipos FF versus ff (JURUTKA et al., 2000). É provável que algumas regiões promotoras do gene da vitamina D possam ser mais sensíveis às diferenças genotípicas do *FokI*, em relação a outras como as localizadas na região 3'-UTR (INGLES et al., 1997).

Um estudo demonstrou a importância de análise funcional de múltiplos polimorfismos do gene VDR (WHITFIELD, 2001). Em uma série de 20 células de linhagem fibroblástica de diferentes genótipos do gene VDR, variantes bialélicas no *FokI* e nos sítios da poli (A), em combinação, alteraram significativamente a ativação transcricional. A atividade maior ou menor do VDR foi relatada com o alelo F em combinação com o comprimento maior poli (A) e com o alelo f em combinação com o comprimento menor da poli (A), respectivamente. Um terceiro possível polimorfismo para atividade funcional do VDR é o SNP G>A entre os exons 1a e 1e, codificando parte da região 5'-UTR. Esta região contém um elemento de ligação para o fator *Cdx-2*, o qual confere uma expressão específica de certos genes no intestino (SUH et al., 1994; JURUTKA et al., 2001). Consistentemente com estas observações, uma maior atividade do VDR, com o aumento da ligação do *Cdx-2* foi encontrado com o alelo A versus o alelo G (ARAI et al., 2001). Dessa forma, o alelo A pode estar associado com uma maior absorção intestinal de cálcio (ARAI et al., 2001; UITTERLINDEN et al., 2004).

Outros polimorfismos em regiões promotoras do gene VDR têm sido descritos e associados com diferenças funcionais (FANG et al., 2005). No geral, esses estudos enfatizam uma necessidade de analisar simultaneamente a interação de diferentes blocos haplotípicos, com cada determinante do VDR, seja

sua expressão ou sua atividade. Além disso, como o gene VDR apresenta múltiplos promotores, resultando em transcrições tecido específicas, também é possível que as variantes alélicas sejam responsáveis por diferenças no balanço de diferentes isoformas do gene VDR dentro do mesmo tecido (CROFTS et al., 1998; REBBECK; SPITZ; WU, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo desse projeto é avaliar os polimorfismos do gene VDR com a susceptibilidade à osteoporose primária pós-menopausa.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência dos SNP do gene do VDR previamente associados à susceptibilidade à osteoporose em pacientes e em controle;
- Avaliar o grau de associação destes polimorfismos com a susceptibilidade à osteoporose;
- Avaliar o grau de associação destes polimorfismos com a gravidade da doença osteoporótica;
- Identificar fatores genéticos de risco ou proteção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHOLME, F. ASPENBERG, P. Wnt signaling and orthopedics, an overview. *Acta Orthop*, v.82, n.2, p.125-130, 2011.

ALBAGA, O.M.E., Ralston, S.H. Genetics of osteoporosis. *Rheum Dis Clin N Am*, v.32, n.4, p.659-680, 2006.

ALBRIGHT, F. Osteoporosis. *Ann Intern Med*, v.27, p.861, 1947.

AMES, S.K. et al. Vitamin D receptor gene Fok I polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J Bone Miner Res*, v.14, n.5, p.740-746, 1999.

ARAI, H. et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*, v.12, n.6, p.915-92, 1997.

ARAI, H. et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res*, v.6, n.7, p.1256-1264, 2001.

ASADA, N. et al. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell*, v.12, n.6, p.737-747, 2013.

BAKHTIYAROVA, S., et al. Vitamin D status among patients with hip fracture and elderly control subjects in Yekaterinburg, Russia. *Osteoporos Int*, v.17, n.3, p.441-446, 2006.

BANDEIRA, F., et al. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.50, n.4, p.640-646, 2006.

BARKER, A.L. Measuring fall risk and predicting who will fall: clinimetric properties of four fall risk assessment tools for residential aged care. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.64, n.8, p.916-924, 2009.

BISCHOFF-FERRARI, H.A., et al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*, v.84, n.1, p.18-28, 2006. [Erratum, *Am. J. Clin. Nutr.*, v.84, vp.1253, 2006.]

BOONEN, S., et al. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int*, n.5, v.78, p.257-270, 2006.

BOURS, S.P. et al. Contributors to secondary osteoporosis and metabolic bone diseases in patients presenting with a clinical fracture. *J Clin Endocrinol Metab*, v.96, n.5, p.1360-1367, 2011.

BRAUN, T.; Schett, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep*, v.10, n.2, p.101-108, 2012.

BROE, K.E., et al. A higher dose of vitamin D reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc*, v.55, n.2, p.234-239, 2007.

BYERS, P.H. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *Med Genet*, v.28, p.433-442, 1991.

CARLING, T. et al. Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nature Med*, v.1, n.12, p.1309-1311, 1995.

CARLING, T. et al. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, v.82, n.6, p.1772-1775, 1997.

CARLING, T. et al. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v.83, n.7, p. 2255-2259, 1998.

CASADO-DÍAZ, A. et al. Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin receptor gene are determining factors of bonemineral density in young healthy postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.136, p.187-189, 2013.

CHAPUY, M.C., et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med*, v.23, n.23, p.1637-1642, 1992.

COLIN, E.M. et. al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Clin Endocrinol*, v.52, n.2, p.211-216, 2000.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, v.94, n.6, p.646-650, 1993.

COOPER, C. et al. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol*, v.137, n.9, p.1001-1005, 1993.

COOPER, C. et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, v.22, n.5, p.1277-1288, 2011.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L.J. Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. *Osteoporos Int*, v.2, n.6, p.285-289, 1992.

COOPER, G.S., UMBACH, D.M.. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res*, v.11, n.12, p.1841-1849, 1996.

CORREA, P. et al. The vitamin D receptor (VDR) start codon polymorphism in primary hyperparathyroidism and parathyroid VDR messenger ribonucleic acid levels. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, n.5, p.1690-1694, 1999.

CROFTS, L. et al. Multiple promoters direct the tissue specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, n.18, p.10529-10534, 1998.

CUDDIHY, M.T. et al. Osteoporose intervention following distal forearm fractures: a missed opportunity? *Arch Intern Med*, v.162, n.4, p.421-426, 2002.

CUMMINGS, S.R. et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med*, v.332, n.12, p.767-773, 1995.

DAWSON-HUGHES, B. et. at. Calcium absorption on high and low calcium intake in relation to Vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, v.80, n.10, p.3657-3661, 1995.

DAWSON-HUGHES, B., et al. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int*, v.16, n.7, p.713-716, 2005

DELUCA, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin. *D Am J Clin Nutr*, v.80, p.1696S-1696S, 2004.

DENG, H.W. et al. Change of bone mass in post-menopausal Caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. *Hum Genet*, v.103, n.5, p. 576-585, 1998.

DIARRA, D. et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*, v.13, n.2, p.1566-163, 2007.

DURRIN, L.K. et al. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*, v.1453, n.3, p. 311-320, 1999.

DUSSO, A.S., BROWN, A.J., SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal*

Physiol, v.289, n.1, p.F8-F28, 2005.

EISMAN, J.A. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*, v.20, n.6, p.788–804, 1999.

EUROPEAN PROSPECTIVE OSTEOPOROSIS STUDY (EPOS) GROUP.
Incidence of vertebral fracture in Europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J Bone Miner Res*, v.17, n.4, p.716-724, 2002.

FALCÓN-RAMÍREZ, E. et al. Association of LRP5 haplotypes with osteoporosis in Mexican women. *Mol Biol Rep*, v.40, n.3, p.2705-2710, 2013.

FANG, Y. et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the Rotterdam Study. *Am J Hum Genet*, v.77, n.5, p.807–823, 2005.

FANG, Y. et al. Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta- analysis. *Bone*, v.39, n.4, p.938–945, 2006.

FANG, Y. et al. Vitamin D receptor gene haplotype is associated with body height and bone size. *J Clin Endocrinol Metab*, v.92, n.4, p.1491–1501, 2007.

FANG, Y. et al.: Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*, v.18, n.9, p.1632–1641, 2003.

FERRARI, S. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet*, v.345, n.8947, p.423–424, 1995.

FERRARI, S. et al. Bone mineral mass and calcium and phosphate metabolism in young men: relationship with vitamin D receptor allelic polymorphisms. *J Bone Miner Res*, v.84, n.6, p.2043–2048, 1999.

FERRARI, S.L. et al. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms ? *J Bone Miner Res*, v.13, n.3, p.363–370, 1998.

FERRARI, S.L., BONJOUR, J.P., RIZZOLI, R., The vitamin D receptor gene and calcium metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, v.9, n.7, p.259–264, 1998.

GARRAWAY, W.M. et al. Limb fractures in a defined population. I. Frequency and distribution. *Mayo Clin Proc*, v.54, n.11, p.701-707, 1979.

GENANT, H.K. et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res*, v.8, p. 1137-1142, 1993.

GENNARI L. et al. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in post-menopausal women. *Calcif Tissue Int*, v.61, n.6, p.460–463, 1997.

GENNARI, L. et al. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.81, n.1, p.1–24, 2002.

GENNARI, L. et al.: Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in post-menopausal women: evidence of multiple gene contribution on bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*, v.83, n.3, p.939–944, 1998.

GENNARI, L. et. al. Steroid hormone receptor gene polymorphisms and osteoporosis: a pharmacogenomic review. *Expert Opin Pharmacother*, v.8, n.5, p. 537–553, 2007.

GIGUERE, Y. et al. The association between heel ultrasound and hormone replacement therapy is modulated by a two-locus vitamin D and estrogen receptor genotype. *J Bone Miner Res*, v.15, n.6, p.1076–1084, 2000.

GOLD, D.T. The nonskeletal consequences of osteoporotic fractures. Psychologic and social outcomes. *Rheum Dis Clin North Am*, v.27, n.1, p.255–262, 2001.

GONG, G. et al. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int*, v.9, n.1, p.55–64, 1999.

GONG, Y. et al. Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group: LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, v.107, n.4, p. 513–523, 2001.

GRAAFMANS, W.C. et al. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *J Bone Miner Res*, v.12, n.8, p. 1241–1245, 1997.

GROSS, C. Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 242, n.3, p.467–473, 1998.

GROSS, C. et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res*, v.11, n.12, p.1850–1855, 1996.

GROSS, C. et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism: a functional analysis of Fok I variants. *J Bone Miner Res*, v.13, n.11, p.1691–1699, 1998.

GRUDTNER, V.S., WEINGRILL, P., FERNANDES, A.L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *R Bras Reumatol*, v.37, n.3, p.143-451, 1997.

GRUNDBERG, E. et al. Vitamin D receptor 3' haplotypes are unequally expressed in primary human bone cells and associated with increased fracture risk: the MrOS study in Sweden and Hong Kong. *J Bone Miner Res*, v.22, n.6, p.832-840, 2007.

HARRISON, R.A. et al. Osteoporosis-related kyphosis and impairments in pulmonary function: a systematic review. *J Bone Miner Res*, v.22, n.3, p.447-457, 2007.

HAUSSLER, M.R. et al.: The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*, v.13, n.3, p. 325-349, 1998.

HEANET, R.P., et al. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr*, v.22, n.2, p.142-146, 2003.

HIRSCHHORN, J.N., Daly, M.J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, v.6, n.2, p.95-108, 2005.

HIRSCHHORN, J.N., GENNARI, L. Bona fide genetic associations with bone mineral density. *N Engl J Med*, v.358, n.22, p.2403-2405, 2008.

HOLICK, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, v. 116, p. 2062-2072, 2006. (A)

HOLICK, M.F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*, v.81, n.3, p.353-373, 2006. (B)

HOLICK, M.F. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med*, v.357 n.3, 2007.

HOLICK, M.F., et al. Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, v.96, n.7, p.1911-1930, 2011.

HOLICK, M.F., et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, n.6, p.3215-3224, 2005.

HOLICK, M.F., GARABEDIAN, M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: FAVUS, M.J., ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6^a ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, p. 129-137, 2006.

HORST-SIKORSKA, W., et al. Vitamin D receptor gene

polymorphisms, bone mineral density and fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Mol Biol Rep*, v.40, n.1, p.383-390, 2013.

HOWARD, G. et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.80, n.9, p.2800–2805, 1995.

HUANG, Q.Y., RECKER, R.R., DENG, H.W. Searching for osteoporosis genes in the post-genome era: progress and challenges. *Osteoporos Int*, v.14, n.9, p.701–715, 2003.

HUNTER, D. et al. A randomized controlled trial of vitamin D supplementation on preventing postmenopausal bone loss and modifying bone metabolism using identical twin pairs. *J Bone Miner Res*, v.15, n.11, p. 2276–2283, 2000.

INADA, M.; MIYAURA, C. Cytokines in bone diseases. Cytokine and postmenopausal osteoporosis. *Clin Calcium*, v.20, n.10, p.1467-1472, 2010.

INGLES, S.A. et al. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.6, n.2, p.93–98, 1997.

IOLASCON, G. et al. The contribution of cortical and trabecular tissues to bone strength: insights from denosumab studies. *Clin Cases Miner Bone Metab*, v.10, n.1, p.47-51, 2013.

JIA, F. et al., Vitamin D receptor BsmI polymorphism and osteoporosis risk: a meta-analysis from 26 studies. *Genet Test Mol Biomarkers*, v.17, n.1, p.30-34, 2013.

Ji, G.R. et al., BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. *Bone*, v.47, n.3, p.681-686, 2010.

JURUTKA, P.W. et al. The polymorphic N-terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*, v.14, n.3, p.401–420, 2000.

JURUTKA, P.W. et al. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*, v.2, n.2, p. 203–216, 2001.

KANIS, J.A. et al. Interpretation and use of FRAX in clinical practice. *Osteoporos Int*, v.22, n.9, p.3395-3411, 2011. www.shef.ac.uk/FRAX/

KANIS, J.A. et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v.9, n.8, p.1137-1141, 1994.

KANIS, J.A. Partial adherence: a new perspective on health economic assessment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. v.22, n.10, p.2265-2573, 2011.

KHAN, S.A. et al. Osteoporose follow-up after wrist fractures following minor trauma. *Arch Intern Med*, v.161, n.10, p.11309-1312, 2001.

KIEL, D. et.al. The Bsm I vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res*, v.12, n.7, p.1049-1057, 1997.

KIEL, D.P. et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*, v.8, n.1, p.S14, 2007.

KIEL, D.P. et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*, v.8, n.1, S14, 2007.

KILLOCK, D. Bone: Osteocyte RANKL in bone homeostasis: a paradigm shift? *Nat Rev Rheumatol*, v.7, n.11, p.619, 2011.

KLOTZBUECHER, C.M. et al. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis *J Bone Miner Res*, v.15, n.4, p.721-739, 2000.

KOAY, M.A., BROWN, M.A. Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton. *Trends Mol Med*, v.3, p.129-137, 2005.

KRALL, E.A. et al. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res*, v.10, n.6, p.978-984, 1995.

KRISHNAN, V.; BRYANT, H.U.; MacDOUGALD, O.A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*, v.116, n.5, p. 1202-1209, 2006.

LACATIVA, P.G.S.; FARIAS M.L.F. Osteoporose e inflamação. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.54, n.2, 2010.

LARSEN, E.R., MOSEKILDE, L., FOLSPANG, A. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res*, v.19, n.3, p.370-378, 2004.

LEE, Y.H. et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies for bone mineral density. *J Hum Genet*, v.51, n.5, p.480–486, 2006.

LEIB, E.S. et al. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom*, v.7, n.1, p.1-6, 2004.

LEWIECKI, E.M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*, v.7, p.631-638, 2011.

LEWIECKI, E.M. Sclerostin: a novel target for intervention in the treatment of osteoporosis. *Discov Med*, v.12, n.65, p.263-273, 2011.

LI, Y.C. et al. Peak spine and femoral neck bone mass in young women. *Bone*, v.32, p.546-555, 2003.

LI, Y., et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep*, v.39, n.5, p.5709-5717, 2012.

LINDSAY, R. Bone loss after cardiac transplantation. *N Engl J Med*, v.350, n.8, p.751-754, 2004.

LINDSAY, R. et al. Osteoporosis: review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteoporos Int*, v.8, n.4 p.3-6, 1998.

LIPS, P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, v.22, n.4, p.477-501, 2001.

LIU, Y. Z. et al. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol*, v.177, n.2, p.147–196, 2003.

MACDONALD, H.M. et al. Large-scale population-based study shows no evidence of association between common polymorphisms of the VDR gene and BMD in British women. *J Bone Miner Res*, v.21, n.1, p.151–162, 2006.

MALABANAN, A.O., TURNER, A.K., HOLICK, M.F. Severe generalized bone pain and osteoporosis in a premenopausal black female: effect of vitamin D replacement. *J Clin Densitometr*, v.1, p.201-4, 1998.

MANI, A. et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, v.315, n.5816, p.1278–1282, 2007.

MANOLAGAS, S.C. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone*, v.54, n.2, p.

272-278, 2013.

MATKOVIC, V. et al. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent female. *Am J Clin Nutr*, v.52, n.5, p.878-88, 1990.

MATSUYAMA, T. et al. Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density. *Lancet*, v.345, n.8959, p.1238-1239, 1995.

MATTHIS, C. et al. Health impact associated with vertebral deformities: results from the European Vertebral Osteoporosis Study(EVOS), *Osteoporos Int*, v.8, n.4, p.364-372, 1998.

McCLURE, L. et al. Vitamin D receptor polymorphisms, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res*, v.12, n.2, p.234-240, 1997.

McKENNA, M. FREANEY, R. Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int*, v.8, n.8, p.3, 1998.

McLEAN, R.R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*, v.7, n.4, p134-139, 2009.

MEBAREK, S. et al. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations. *Int J Mol Sci*, v.14, n.3, p. 5036-5129, 2013.

MELTON, L.J. Epidemiology of hip fractures: implications of the exponential increase with age. *Bone*, v.18, n.3, p.121-125, 1996.

MICHAELSSON, K. et al. The positive effect of dietary vitamin D intake on bone mineral density in men is modulated by the polyadenosine repeat polymorphism of the vitamin D receptor. *Bone*, v.39, n.6, p.1343-1351, 2006.

MOCHARLA, H. et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *J Bone Miner Res*, v.12, p.726-733, 1997.

MOREIRA, R.O. DUARTE, M.P., FARIAS, M.L. Distúrbios do eixo cálcio-PTH-vitamina D nas doenças hepáticas crônicas. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.48, n.4, p.443-450, 2004.

MORISHIMA, A. et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, v.80, n.12, p.3689–3698, 1995.

MORITA, A. et al.: Effects of the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene and lifestyle factors on bone mineral density in a representative sample of Japanese women: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Calcif Tissue Int*, v.77, n.6, p.339–347, 2005.

MORRISON, N.A. et al. Vitamin D receptor genotypes influence the success of calcitriol therapy for recurrent vertebral fracture in osteoporosis. *Pharmacogenet Genomics*, v.15, n.2, p.127–135, 2005.

MORRISON, N.A. et al. Contribution of trans-acting factors alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.89, n.15, p.6665–6669, 1992.

MORRISON, N.A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, v.367, n.6460, p.284–287, 1994.

NEWTON-CHEH, C., HIRSCHHORN, J.N. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*, v.573, n.1,2, p.54–69, 2005.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, v.285, n.6, p.785–795, 2001.

OHTERA, K., ISHII, S., MATSUYAMA, T. Influence of the vitamin D receptor alleles on human osteoblast-like cells. *J Bone Joint Surg*, v.83, n.1, p.134–138, 2001.

ORLIC, Z.C.; RAISZ, L.G. Causes of secondary osteoporosis. *J Clin Densitom*, v.2, n.1 p.79–92, 1999.

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.*, v.11, n.8, p.1043–1051, 1996

PALOMBA, S. et al. BsmI vitamin D receptor genotypes influence the efficacy of antiresorptive treatments in postmenopausal osteoporotic women. A 1-year multicenter, randomized and controlled trial. *Osteoporos Int*, v.16, n.8, p.943–952, 2000.

PATERNOSTER, L. et al. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and gothenburg osteoporosis and

obesity determinants cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*, v.95, n.8, p.3940-3948, 2010.

PEACOCK, M. et al. Sex-specific and non-sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone mineral density in men. *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, n.5, p.3060-3066, 2005.

PEDROSA, M.A.C., CASTRO, M.L. Papel da Vitamina D na função neuromuscular. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.49, n.4, p.495-502, 2005.

PERCEGONI, N. et al. Profile of Serum IL-1 β and IL-10 Shortly after Ovariectomy and Estradiol Replacement in Rats. *Horm Metab Res*, v.41, n.1, p.50-54, 2009.

PETTIFOR, J.M. Vitamin D deficiency and nutritional rickets in children in vitamin D. In: FELDMAN, D. et al. eds. *Vitamin D*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, p.1065-1084, 2005.

PLOTNIKOFF, G.A., QUIQLEY, M. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clin Proc*, n.12, v.78, p.1463-1470, 2003.

POCOCK, N.A. et al. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest*, v.80, n.3, p. 706-710, 1987.

POURESMAEILI, F., et al. Association between Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism and Bone Mineral Density in A Population of 146 Iranian Women. *Cell J*, v.15, n.1, p.75-82, 2013.

PREMAOR, M.O., FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.50, n.1, p.25-37, 2006.

RAHNAMA, M. et al. IL-1 α and IL-1 β Levels in Blood Serum and Saliva of Menopausal Women. *Endocr Res*, v.38, n.2, p.69-76, 2013.

RAIMONDI, S., et al. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. *Carcinogenesis*, v.30, n.7, p.1170-80, 2009.

RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J Clin Invest*, v.115, n.12, p. 3318-3325, 2005.

RALSTON, S.H., CROMBRUGGHE, B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev*, v.20, n.18, p. 2492-2506, 2006.

RAY, N.F. et al. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in

the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res*, v.12, n.1, p.24-35, 1997.

REBBECK, T.R., SPITZ, M., WU, X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet*, v.5, n.8, p.589-597, 2004

RICHARDS, J.B. et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*, v.371, n.9623, p.1505-1512, 2008.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Involutional Osteoporosis. *N Engl J Med*, v.314, n. 26, p.1676-1686, 1986.

SALAMONE, L.M. et al. Determinants of pre-menopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. *J Bone Miner Res*, v.11, n.10, p.1557-1565, 1996.

SARAIVA, G.L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Ar Bras Endocrinol Metab*, v.46, n.1, 2002.

SEEMAN, E. et al. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab*, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

SEEMAN, E. et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med*, v.320, n.9, p. 554-558, 1989.

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 - *in press*.

SHIEKH, M. et al. Role of vitamin D dependent and vitamin D independent mechanisms in absorption of food calcium. *J. Clin. Invest.*, v.81, n.1, p.126-132, 1988.

SIDDIQUI, N.A.; Owen J.M. Clinical advances in bone regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*, v.8, n.3, p.192-200, 2013.

SLEMENDA, C.W. et al. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res*, v.6, n.6, p. 561-567, 1991.

SMITH, E.P. et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. *N Engl J Med*, v.331, n.16, p.1056-1061, 1994.

SOLIMEO, S.L.; WEBER, T.J.; GOLD, D.T. Older men's explanatory model for

osteoporosis. *Gerontologist*, v.51, n.4, p.530-539, 2011.

SOROKO, S.B. et al. Family history of osteoporosis and bone mineral density at the axial skeleton: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res*, v.9, n.6, p.761-769, 1994.

STATHOPOULOU, M.G. et al., The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the bone mineral density of Greek postmenopausal women with low calcium intake. *J Nutr Biochem*, v.22, n.8, p.752-757, 2011.

STYRKARSDOTTIR, U. et al. Multiple genetic loci for mineral density and fracture. *N Engl J Med*, v.358, n.22, p.2355-2365, 2008.

SUAREZ, F., ROSSIGNOL, C., GARABEDIAN, M. Interactive effect of estradiol and vitamin D receptor gene polymorphisms as a possible determinant of growth in male and female infants. *J Clin Endocrinol Metab*, v.83, n.10, p.3563-3568, 1998.

SUH, E. et al. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol*, v.4, n.11, p.7340-7351, 1994.

TERAUCHI, M. Role of the immune system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *Nihon Rinsho*, v. 69, n.7, p.1215-1219, 2011.

THAKKINSTIAN, A. et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study: *J Bone Miner Res*, v.19, n.3, p.419-428, 2004.

THOMAS, T. New actors in bone remodelling: a role for the immune system. *Bull Acad Natl Med*, v.194, n.8, p.1493-1503, 2010.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, v.338, n.2, p.143-156, 2004.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Large-scale analysis of association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: the GENOMOS study. *Ann Int Med*, v.145, n.4, p.255-264, 2006.

VAN STAA, T.P. et al. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone*, v.29, n.6, p.517-522, 2001.

VELDMAN, C.M., CANTORNA, M.T., DELUCA, H.F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*, v.374, n.2, p.334-8, 2000.

VERBEEK, W. et al. Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the TaqI restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun*, v.238, n.1, p.77–80, 1997.

WHITFIELD, G.K. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*, v.177, n.1–2, p.145–159, 2001.

WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, v.843, p.1–129, 1994.

WILLING, M. et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res*, v.13, n.4, p.695–705, 1998.

WISHART, J.M. et al. Relations between calcium intake, calcitriol, polymorphisms of vitamin D receptor gene and calcium absorption in pre-menopausal women. *Am J Clin Nutr*, v.65, n.3, p.798–802, 1997.

XIONG, J.; O'Brien, C.A. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res*, v.27, n.3, p.499–505, 2012.

YAMAGATA, M. et al. Analysis of the stable levels of messenger RNA derived from different polymorphic alleles in the vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Metab*, v.17, n.3, p.164–170, 1999.

YAMAGATA, Z. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet*, v.344, n.8928, p.1027, 1994.

YOKOYAMA, K. et al. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. *Kidney Intl*, v.53, n.2, p.454–458, 1998.

YOLDEMIR, T. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric*, v.14, n.3, p. 384–389, 2011.

ZIAMBRAS, K. DAGOGO-JACK, S. Reversible muscle weakness in patients with vitamin D deficiency. *West J Med*, v.167, n.6, p.435–439, 1997.

ZMUDA, J.M., KAMMERER, C.M. Snipping away at osteoporosis susceptibility. *Lancet*, v.371, n.9623, p.1479–1480, 2008.

ARTIGO***Título***

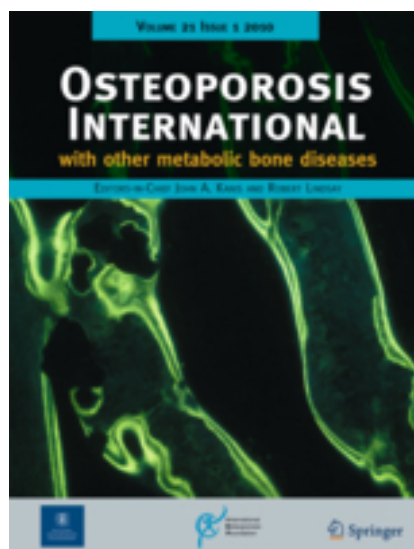
VITAMIN D RECEPTOR POLYMORPHISMS AND ITS IMPLICATION FOR
POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS IN BRAZILIAN WOMEN

Autores

Alexandre Domingues Barbosa, Thiago Sotero Fragoso, Jaqueline de Azevedo Silva, Ângela
Luzia Branco Pinto Duarte, Sergio Crovella, Paula Sandrin-Garcia

A ser submetido à Revista Osteoporosis International

(Fator de impacto 2012: 4.039)



VITAMIN D RECEPTOR POLYMORPHISMS AND ITS IMPLICATION FOR POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS IN BRAZILIAN WOMEN

Alexandre Domingues Barbosa¹, Thiago Sotero Fragoso², Jaqueline de Azevedo Silva³,
Ângela Luzia Branco Pinto Duarte¹, Sergio Crovella^{3,4}, Paula Sandrin-Garcia^{3,4}

Affiliation

1. Division of Rheumatology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

2. Division of Rheumatology, University Hospital, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas, Brazil

3. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

4. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author:

Paula Sandrin-Garcia; e-mail: paula.sandrin@ufpe.br

Department of Genetics/ Federal University of Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Recife/ Brazil CEP 50760-901

Telephone/ Fax 55 8121268522

Abstract

Summary We evaluated the role of VDR gene polymorphisms in the predisposition to osteoporosis in postmenopausal Brazilian women and modulation of the pathological phenotype of the disease.

Introduction This manuscript aims to analyze the association of VDR gene polymorphisms and osteoporosis susceptibility.

Methods The study was performed with 146 postmenopausal women osteoporosis and 95 postmenopausal women healthy. **Results** No significant correlation with VDR polymorphisms was detected between patients and controls. Moreover, no association was found among VDR polymorphisms and vitamin D levels, body mass index (BMI), fractures, falls, menopause, smoking or medication use. When we compared patients below/above 60 years old, was observed susceptibility between T/T genotype (rs3890733) and patients below 60 years old (OR=5.16, CI=1.10-24.10, $p=0.043$). We also observed an association with risk factors between G/G genotype (rs1168268) and BMD at total hip (OR=151.59, CI=31.33-271.80, $p=0.042$). When we compared the patients from European-derived and African-derived ethnic group, T/T genotype (rs1540339) was observed protection among patients European-derived group (OR=0.20, CI=0.05-0.80, $p=0.043$).

Conclusions The T/T genotype of the TagSNP rs3890733 (C>T) configured a risk factor to develop postmenopausal osteoporosis in individual below 60 years. Another association was found between BMD of total hip and the G/G genotype of the TagSNP rs1168268 (A>G). This genotype could be an attenuated factor for the patients with hip osteoporosis. Furthermore, the T/T genotype of the TagSNP rs1540339 (C>T) configured a protector factor in individuals from European-derived group.

Keywords: Vitamin D receptor, Genetic Polymorphisms, Osteoporosis

Introduction

Osteoporosis is a skeletal condition characterized by low bone mass, which is associated with reduced bone strength and increased risk of fractures. It's the clinical consequence of disequilibrium between bone production and reabsorption, regulated by different factors. Throughout life, older bone is periodically resorbed by osteoclasts at discrete sites and replaced with new bone made by osteoblasts. This process is known as bone remodeling [1,2]. An oversupply of osteoclasts relative to the need for remodeling, or an undersupply of osteoblasts due to the need for cavity repair are the seminal pathophysiological changes in osteoporosis [3]. It's well accepted that osteoporosis can be caused by various endocrine, metabolic and mechanical factors, especially the lack of vitamin D.

Vitamin D is a steroidal hormone, whose major function consists in the regulation of calcium homeostasis, bone formation and reabsorption, interaction ways with parathyroid glands, kidneys and intestines [4]. The major source of vitamin D is at produced skin tissues after exposure to ultraviolet B (UVB) radiation, which exerts its biological effect through its receptor (VDR), which is widely distributed in the body [4].

VDR is a nuclear receptor of 50 kDa, class 2 family of steroid receptors, similar to retinoic acid receptors and thyroid-stimulating hormone [5]. $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ binds to the nuclear VDR genome and determines a genomic response by regulating the transcription of some genes [6]. The VDR gene is located on chromosome position 12q13.1. It's consists of nine exons distributed among regions 5'-UTR promoter and 3'-UTR (regulatory). Changes in the molecular structure of this receptor may affect the biological action of vitamin D on bone. [7].

VDR is highly polymorphic with more than sixty described polymorphisms, including eight protein-encoding exons (exons 2-9) and six untranslated exons (exons 1a-1f), which are resulted of alternative splicing, eight introns and two promoter regions [8,9]. Polymorphisms in VDR sequence may altered the gene function and vitamin D_3 action. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in VDR gene have been described, but mainly four namely: *TaqI*, *BsmI*, *ApaI* and *FokI* are intensively studied [9]. Despite the fact that possibly *BsmI*, *TaqI* and *ApaI* have no functional effect, studies report that in linkage disequilibrium, the interaction between them can produce a phenotypic effect. [8].

VDR polymorphisms has been implicated with skeletal growth, bone turnover markers, rates of bone loss in patients with epilepsy, multiple sclerosis, thalassemia, Turner syndrome, idiopathic scoliosis in adolescents, and susceptibility to the breast, ovarian and colon cancer

[10-20].

Regarding the effects of vitamin D on bone metabolism, we evaluated the association between *VDR* genetic polymorphisms and susceptibility and severity of postmenopausal osteoporosis.

Methods

Patients

The study of case-control was performed with 146 osteoporotic postmenopausal women and 95 healthy postmenopausal women that were recruited from the Division of Rheumatology at Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil. Menopause was defined as amenorrhea for at least 1 years in women over 45 years old without any other obvious pathological or physiological cause [21]. Causes of secondary osteoporosis were excluded by medical history, physical examination and laboratory tests [22,23]. No woman was on hormone replacement therapy. In the absence of a fragility fracture, bone mineral density (BMD) by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) was used to diagnose osteoporosis according to the classification of the World Health Organization (WHO)[24]. Plain x-ray of the dorsolumbar spine and hip were performed to diagnose osteoporotic fractures. A data collection protocol was elaborated for data recording and completed by rheumatologists. Information was obtained directly from the patients and their medical records. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Federal University of Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 513/11)..

Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D) serum levels

25(OH)D were determined by Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) (LIAISON®, DiaSorin). Normal 25(OH)D serum levels were defined as values ≥ 30 ng/mL, insufficiency as values 20 - 30 ng/mL and deficiency as values <20 ng/mL [25].

Measurement of Bone Mineral Density (BMD)

Measure by the Dual Energy X-ray Absorptiometry (Lunar Corporation, Madison, WI,

USA) at the lumbar spine (LS) from L1 to L4 anteroposteriorly and the proximal femur, including the femoral neck (FN), Ward's triangle and trochanter. The results are expressed in g/cm^2 and T-score. We used a local database (reference population aged 20 to 29 years) to calculate the T-score. The mean ($\pm$ SD) of normal values for women was 1.085 g/cm^2 (± 0.1) at the lumbar spine, 0.913 g/cm^2 (± 0.12) at the femoral neck and 0.316 g/cm^2 (± 0.07) at the distal radius. The *in vivo* precision error of the equipment employed in the study expressed in percentage coefficient of variation (%CV = SD + mean BMD of repeated measurements) was 0.9% for the lumbar spine on the anteroposterior view and 1.2% for the femoral neck.

SNPs Selection and VDR genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, MA) and standard extraction protocol according to manufacturer's instructions. Polymorphisms were selected using the SNPBrowser software 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). We selected three TagSNPs (rs11168268, rs1540339 and rs3890733), tagging some of the most studied polymorphisms (*TaqI*, *BsmI*, *ApaI*) for this association study. The list of the assessed VDR TagSNPs is in Supplementary data 1. Figure 1 describes the coverage area from each tested SNP and its position throughout the VDR gene. All TagSNPs had least 10% Minimum Allele Frequency (MAF) (Table 2). Genotyping was performed with commercially available fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the ABI7500 Real Time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Allelic discrimination followed as recommended by the manufacturer and analyzed using the SDS software 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical Analysis

Allelic and Genotypic frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium were performed by using the SNPStats tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). The Exact Fisher Test was applied to determine the statistical significance of all comparisons. Haploview Software (version 4.2) was used for haplotype associations. "SNPassoc" R package (R software, version 2.12.2), developed for genetic studies, was used for evaluating the association between SNPs and postmenopausal osteoporosis susceptibility and severity [26]. P-values <0.05 were

considered statistically significant.

Results

In total, 146 patients with postmenopausal osteoporosis were included in our analysis, with the mean level of 25(OH)D of 27.99 ng/mL. Low serum level of 25(OH)D were observed in 89/146 (60,95%) and vitamin D deficiency in 68/146 (45.58%). No significant correlation *VDR* polymorphisms were detected between patients and controls (Table 3). Moreover, no association was found between *VDR* polymorphisms and vitamin D levels, BMI, fractures, menopause, smoking or medication use. The Table 1 presents demographic, clinical and laboratory findings in postmenopausal osteoporosis patients.

The *VDR* allelic and genotypic frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium in osteoporosis patients and healthy controls. Haplotype analysis was performed to assess linkage disequilibrium among the tested Tag SNPs. No linkage disequilibrium for the *VDR* assessed polymorphisms was observed (Fig.3). The haplotype combination did not provide any association neither to osteoporosis susceptibility or osteoporosis with fragility fractures. No gene-gene interactions (epistasis) were detected in our study (Fig. 1).

When we compared patients below/above 60 years old, a higher frequency of the T/T genotype was observed association among individuals below 60 years old and the TagSNP rs3890733 (OR=5.16, CI=1.10-24.10, $p=0.043$) in a codominant model. At same time, in a recessive model, a higher frequency of T/T genotype among individuals below 60 years old was observed (OR=5.12, CI=1.13-23.27, $p=0.012$) (Table 4).

We also observed a higher BMD at total hip among patients with G/G genotype of the TagSNP rs1168268 (OR=151.59, CI=31.33-271.80, $p=0.042$) in codominant and dominant model (OR=106.02, CI=14.70-197.30, $p=0.024$) (Table 5).

When we compared the patients from European-derived and African-derived ethnic group, a higher frequency of the T/T genotype was observed among individuals from European-derived group at TagSNP rs1540339 in a codominant model (OR=0.20, CI=0.05-0.80, $p=0.043$) and in a recessive model (OR=0.24, CI=0.06-0.94, $p=0.029$) (Table 6).

Discussion

Vitamin D is a steroidal hormone which the major circulating form is 25(OH)D₃

commonly used as an indicator of vitamin D₃ status, whereas 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) is the biologically active form of vitamin D₃. Vitamin D exerts its biological action through linkage with Vitamin D Receptor (VDR) [27,28].

The city of Recife, in the Brazilian state of Pernambuco, where the investigation was carried out, has tropical, warm and humid climate, with mean annual temperature of 25.2 °C. Recife is located at latitude of 8° 04' 03" South and longitude of 34° 55' 00" West, and high insolation indices throughout the year [29]. Despite of the geographical location and climate characteristics, inadequate levels of 25(OH)D (< 30 ng/mL) were found in 60.95% of the patients.

The high prevalence of vitamin D insufficiency/deficiency found in this study, which was carried out in a high insolation region, is similar of another two researches developed in the same city in patients with systemic lupus erythematosus and healthy individuals [30] and in patients with postmenopausal osteoporosis [31]. Thus, the data observed in this research serve to ratify the notion that only the abundance of sunlight in a region may not prevent vitamin D insufficiency/deficiency and to alert the necessity to study the implication of genetic factors and lifestyle in the levels of vitamin D.

To our knowledge, this is the first research to investigate the association of VDR gene polymorphisms on postmenopausal osteoporosis in a Brazilian population. The main aim was identify SNPs in other sites of the gene, in addition to traditional studied. For this reason we evaluated 3 TagSNPs, which tagging promoter region, 5'UTR and 3'UTR beyond some of the most studied polymorphisms (*TaqI*, *BsmI* and *ApaI*).

There is much evidence, which confirm the link between postmenopausal osteoporosis susceptibility and VDR gene polymorphisms in different populations around the world [32-41]. However, studies have been demonstrated no association between postmenopausal osteoporosis susceptibility and VDR gene polymorphisms [35,42-48]. In our study, after compared patients and healthy controls, we didn't observe significant correlation between postmenopausal osteoporosis susceptibility and VDR gene polymorphisms, although two important SNPs, *FokI* and *Cdx-2*, were not tagging [37,49-52]. Despite VDR polymorphisms could interfere on serum level of vitamin D [53-55], we did not observed significant correlation in our study. Thus, different genetic polymorphisms at vitamin D binding protein, or another protein implicated on serum levels of vitamin D must be investigated [56-58].

When we evaluated two different osteoporosis patients subsets according age (below and above 60 years old) was verified that the T/T genotype of the TagSNP rs3890733 (C>T)

configured a risk factor to develop postmenopausal osteoporosis in individual below 60 years old. Thus, T/T genotype at this SNP can be a possible genetic marker of osteoporosis in this group.

The first ten years after menopause, women show a marked loss of bone mass. The fact that estrogen represent one of the main participants of physiological bone remodeling. Its deficiency after menopause causes increased production of cytokines such as IL-1, IL-6, TNF which increase the half-life of the osteoclast and the differentiation of pre-osteoclastic cells in mature osteoclasts. It also changes the balance between RANKL and OPG, which favors osteoclastogenesis. The lack of the hormone also decreases the number of osteoblasts and osteocytes which impairs the detection of microdamage and immediate repair of bone mass[59-61].

The association between TagSNP rs3890733 and osteoporotic women during the first 10 years of menopause (between 50 and 60 years) is consistent with the physiology of postmenopausal osteoporosis. Possibly the elevated levels of cytokines, during the first year after the menopause, can activate and thereby alter the expression of the VDR gene and producing an altered protein structure that blocks the VDR receptor function and leading to bone loss in women below 60 years old. It would be interesting that future studies assess the VDR polymorphisms and their association with cytokine levels in recent postmenopausal women.

Another association found was between BMD of total hip and TagSNP rs11168268 (A>G). Among patients who had G/G genotype the BMD of total hip was higher than patients who had A/A genotype. So the presence of the G/G genotype could be an attenuated factor for the patients with hip osteoporosis. This TagSNP could improve the BMD in these patients. It covers three well recognize SNPs (*ApaI*, *BsmI* and *TaqI*) that may have potential to influence the stability of RNAm at VDR gene [62]. Some studies observed association between the presence of these restriction sites (*ApaI*, *BsmI* and *TaqI*) with increased BMD, or a higher peak bone mass, and even with a decrease in bone loss [63-68].

The results found in our study may be explained by the fact that *BsmI* polymorphism is associated with bone mass of the spine and femoral sites, improving bone structure at these sites [63,64]. Other studies have shown a statistically significant association ($p < 0.05$) between polymorphisms *BsmI* and *ApaI* (both target TagSNP 11168268), with a higher hip BMD in postmenopausal women [65,69]. These facts explain the reduced bone loss at the hip.

Furthermore, it is possible that these polymorphisms are in linkage disequilibrium with

as yet unidentified functionally important allelic sites located elsewhere in the VDR gene, or to a nearby gene that plays a role in phenotypic traits like a higher bone mass [70,71].

On the other hand, at the TagSNP rs1540339 (C>T), the T/T genotype configured a protector factor in individuals from European-derived group. Although association studies between ethnicity / race and BMD observed that black women have a higher BMD and lower rate of fragility fractures than white women [72-74]. In our study we found a correlation between TagSNP and lower rate of bone loss among women white which would represent a protective factor in this group. However variables such as rate of bone turnover, bone geometry, calcium intake, vitamin D status, body composition, life-style and cultural, social and economic factors, may contribute to bone mass reflecting the rich diversity and flexibility in adaptation that is peculiar to human species. Thus, further studies are important to corroborate our findings.

Finally, postmenopausal osteoporosis is a multifactorial and polygenic disease, where environmental factors interact with genetic factors, causing the pathological phenotype. Thus, further studies in Brazil are necessary to ratify our findings, and better understanding the real role of VDR gene polymorphisms.

Significant progress has been made in the at least years, but there remains much to be done in unraveling this complex interaction between vitamin D receptor gene and osteoporosis susceptibility and severity.

Acknowledgment

This work was supported by the Brazilian funding agencies: FACEPE and CNPq.

Conflict of interest

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Reference

[1]Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17(10):1235

[2]Delmas PD (2002) Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359(9322):2018–2026

[3]Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2):115

[4]Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 66(9):1137-1142

[5] DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80(6 Suppl):1689S–1696S

[6]Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Choi M (2001) Threedimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids* 66(3-5):177–187

[7] Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S et al (1997) Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 11(8):1165–1179

[8]Köstner K, Denzer N, Müller CSL, Klein R, Tilgen W, Reichrath J (2009) The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer res* 29(9):3511–3536

[9]Zhang J, Li W, Liu J, Wu W, Ouyang H, Zhang Q, et al (2012) Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis. *Mol Cell Endocrinol* 15:355(1):135–142

[10]Phabphal K, Geater A, Limapichart K, Sathirapanya P, Setthawatcharawanich S, Witeerungrot N, Thammakumpee N, Leelawattana R (2013) The association between BsmI polymorphism and bone mineral density in young patients with epilepsy who are taking phenytoin. *Epilepsia* 54(2):249-255

- [11]Peralta López M, Centeno V, Miras M, Silvano L, Pérez A, Muñoz L, Sobrero G, Ulla M, Tolosa de Talamoni N (2012) Association of vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism with bone markers in Turner syndrome patients. *J Pediatr Endocrinol Metab* 25(7-8):669-671
- [12]Cox MB, Ban M, Bowden NA, Baker A, Scott RJ, Lechner-Scott J (2012) Potential association of vitamin D receptor polymorphism Taq1 with multiple sclerosis *Mult Scler* 18(1):16-22
- [13]Singh K, Kumar R, Shukla A, Phadke SR, Agarwal S (2012) Status of 25-hydroxyvitamin D deficiency and effect of vitamin D receptor gene polymorphisms on bone mineral density in thalassemia patients of North India. *Hematology* 17(5):291-296
- [14]Peralta López M, Miras M, Silvano L, Pérez A, Muñoz L, Centeno V, Sobrero G, Ulla M, Tolosa de Talamoni N (2011) Vitamin D receptor genotypes are associated with bone mass in patients with Turner syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 24(5-6):307-312
- [15]Jehan F, Voloc A, Esterle L, Walrant-Debray O, Nguyen TM, Garabedian M (2010) Growth, calcium status and vitamin D receptor (VDR) promoter genotype in European children with normal or low calcium intake. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121(1-2):117-120
- [16]Suh KT, Eun IS, Lee JS (2010) Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 19(9):1545-1550
- [17]Fang Y, van Meurs JB, Rivadeneira F, van Schoor NM, van Leeuwen JP, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG (2007) Vitamin D receptor gene haplotype is associated with body height and

bone size. *J Clin Endocrinol Metab* 92(4):1491-501

[18]Liu Y, Li C, Chen P, Li X, Li M, Guo H, Li J, Chu R, Wang H (2013) Polymorphisms in the Vitamin D Receptor (VDR) and the Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 8(6):e66716

[19]Shahbazi S, Alavi S, Majidzadeh-A K, Ghaffarpour M, Soleimani A, Mahdian R (2013) BsmI but not FokI polymorphism of VDR gene is contributed in breast cancer. *Med Oncol* 30(1):393

[20]Gündüz M, Cacina C, Toptaş B, Yaylım-Eraltan İ, Tekand Y, İsbir T (2012) Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with colon cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 16(9):1058-1061

[21]Samsioe G (1995) The menopause revisited. *Int J Gynaecol Obstet* 51(1):1-13

[22]Tannenbaum C, Clark J, Schwartzman K, Wallenstein S, Lapinski R, Meier D, Luckey M (2002) Yield of laboratory testing to identify secondary contributors to osteoporosis in otherwise healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 87(10):4431-4437

[23]Polymeris A, Michalakis K, Sarantopoulou V (2013) Secondary osteoporosis - an endocrinological approach focusing on underlying mechanisms. *Endocr Regul* 47(3):137-148

[24]WHO Study Group (1994) Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (Technical Report Series). World Health Organization, Geneva, Switzerland

[25]Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3):266-281

[26]González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23(5):644–645

[27]Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Choi M (2001) Threedimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids* 66(3-5):177–187

- [28]Hollis BW (1996) Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcif Tissue Int* 58:4–5
- [29]Prefeitura da Cidade do Recife. A cidade do Recife. Available from: www.recife.pe.gov.br/pr/secplanejamento/inforec
- [30]Fragoso TS, Dantas AT, Marques CD, Rocha Junior LF, Melo JH, Costa AJ, Duarte AL (2012) 25-Hydroxyvitamin D3 levels in patients with systemic lupus erythematosus and its association with clinical parameters and laboratory tests. *Rev Bras Reumatol* 52(1):60-65
- [31]Bandeira F, Griz, L, Freese E, Lima, DC, Thé AC, Diniz ET, Marques TF, Lucena, CS (2010) Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54(2), 227-232
- [32]Stathopoulou MG, Dedoussis GV, Trovas G, Theodoraki EV, Katsalira A, Dantas IA, Hammond N, Deloukas P, Lyritis GP (2011) The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the bone mineral density of Greek postmenopausal women with low calcium intake. *J Nutr Biochem* 22(8):752-757
- [33]Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz PM, Bartkowiak-Wieczorek J, Marcinkowska M, Wawrzyniak A, Slomski R, Kalak R, Czerny B, Horst-Sikorska W (2009) Correlation of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism with osteoporotic changes in Polish postmenopausal women. *Neuro Endocrinol Lett* 30(4):540-6
- [34]Dundar U, Solak M, Kavuncu V, Ozdemir M, Cakir T, Yildiz H, Evcik D (2009) Evidence of association of vitamin D receptor Apa I gene polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Rheumatol* 28(10):1187-91
- [35]Zintzaras E, Rodopoulou P, Koukoulis GN (2006) BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: a meta-analysis. *Dis Markers* 22(5-6):317-326
- [36]Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, Cáceres

E, Carreras R, Mellibovsky L, Balcells S, Díez-Pérez A, Grinberg D (2007) COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 18(2):235-243

[37]Ivanova J, Doukova P, Boyanov M, Popivanov P (2006) FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random Bulgarian population sample. *Endocrine* 29(3):413-418

[38]Pouresmaeili F, Jamshidi J, Azargashb E, Samangouee S (2013) Association between Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism and Bone Mineral Density in A Population of 146 Iranian Women. *Cell J* 15(1):75-82

[39]Li Y, Xi B, Li K, Wang C (2012) Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep* 39(5):5709-5717

[40]Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J (2004) Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 19(3):419-428

[41]Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz PM, Bartkowiak-Wieczorek J, Marcinkowska M, Wawrzyniak A, Slomski R, Kalak R, Czerny B, Horst-Sikorska W (2009) Correlation of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism with osteoporotic changes in Polish postmenopausal women. *Neuro Endocrinol Lett* 30(4):540-546

[42]Jiménez-Salas Z, Hernández-Tobías EA, Ramírez-López TE, Campos-Góngora E (2012) Association of polymorphism TaqI of vitamin D receptor with bone mineral density in young Mexican women. *Nutr Hosp*. 27(5):1505-1510

[43]Thakkestian A, D'Este C, Attia J (2004) Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 15(9):729-734

[44]Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H, Marumo F; JPOS Study Group (2004) Prediction of bone mineral density from vitamin D

receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese Women. The Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Int J Epidemiol* 33(5):979-988

[45]Fang Y, Rivadeneira F, van Meurs JB, Pols HA, Ioannidis JP, Uitterlinden AG (2006) Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 39(4):938-945

[46]Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL et al (2006) The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 145(4):255-264

[47]Yoldemir T, Yavuz DG, Anik G, Verimli N, Erenus M (2011) Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric* 14(3):384-391

[48]Qin G, Dong Z, Zeng P, Liu M, Liao X (2013) Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of osteoporosis: a meta-analysis of 41 studies. *Mol Biol Rep* 40(1):497-506

[49]Bandrés E, Pombo I, González-Huarriz M, Rebollo A, López G, García-Foncillas J (2005) Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest* 28(4):312-321

[50]Falchetti A, Sferrazza C, Cepollaro C, Gozzini A, Del Monte F, Masi L, Napoli N, Di Fede G, Cannone V, Cusumano G, Pandolfo MC, Rini GB, Tanini A, Brandi ML (2007) FokI polymorphism of the vitamin D receptor gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian island of Lampedusa. *Calcif Tissue Int* 80(1):15-20

[51]Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG (2003) Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*

18(9):1632-1641

[52]Casado-Díaz A, Cuenca-Acevedo R, Navarro-Valverde C, Díaz-Molina C, Caballero-Villarraso J, Santiago-Mora R, Dorado G, Quesada-Gómez JM (2013) Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:187-189

[53]Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, Spritzer PM (2012) Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr* 12:62

[54]Kitanaka S, Isojima T, Takaki M, Numakura C, Hayasaka K, Igarashi T (2012) Association of vitamin D-related gene polymorphisms with manifestation of vitamin D deficiency in children. *Endocr J* 59(11):1007-1014

[55]Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP (2004) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 1;338(2):143-156

[56]Nimitphong H, Saetung S, Chanprasertyotin S, Chailurkit LO, Ongphiphadhanakul B (2013) Changes in circulating 25-hydroxyvitamin D according to vitamin D binding protein genotypes after vitamin D₂ or D₃supplementation. *Nutr J* 4;12:39

[57]Santos BR, Mascarenhas LP, Boguszewski MC, Spritzer PM (2013) Variations in the vitamin D-binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study. *Horm Res Paediatr*.79:162-168

- [58]Perna L, Felix JF, Breitling LP, Haug U, Raum E, Burwinkel B, Schöttker B, Brenner H (2013) Genetic variations in the vitamin D binding protein and season-specific levels of vitamin D among older adults. *Epidemiology* 24(1):104-109
- [59]Rahnama M, Jastrzębska I, Jamrogiewicz R, Kocki J. (2013) IL-1 α and IL-1 β Levels in Blood Serum and Saliva of Menopausal Women. *Endocr Res* 38(2):69-76
- [60]Terauchi M (2011) Role of the immune system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *Nihon Rinsho* 69(7):1215-1219.
- [61]Pacifci R (1996) Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11(8):1043-1051
- [62]Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV et al (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367(6460):284–287
- [63]Qin YJ, Zhang ZL, Huang QR, He JM, Hu YQ, Zhao Q, Lu JH, Li M, Liu YJ (2004) Association of vitamin D receptor and estrogen receptor-alpha gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin* 25(4):462-468
- [64]Jakubowska-Pietkiewicz E, Młynarski W, Klich I, Fendler W, Chlebna-Sokół D (2012) Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients. *Mol Biol Rep* 39(5):6243-6250
- [65]Li Y, Xi B, Li K, Wang C (2012) Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep* 39(5):5709-5717
- [66]Ozaydin E, Dayangac-Erden D, Erdem-Yurter H, Derman O, Coşkun T (2010) The relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density, osteocalcin level and growth in adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 23(5):491-496
- [67]Creatsa M, Pliatsika P, Kaparos G, Antoniou A, Armeni E, Tsakonas E, Panoulis

C, Alexandrou A, Dimitraki E, Christodoulakos G, Lambrinoudaki I (2011) The effect of vitamin D receptor BsmI genotype on the response to osteoporosis treatment in postmenopausal women: a pilot study. *J Obstet Gynaecol Res* 37(10):1415-1422

[68] Pouresmaeili F, Jamshidi J, Azargashb E, Samangouee S (2013) Association between Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism and Bone Mineral Density in A Population of 146 Iranian Women. *Cell J* 15(1):75-82

[69] Mitra S, Desai M, Ikram Khatkhatay M. (2006) Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas* 20;55(1):27-35

[70] Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW (1997) Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 11(8):1165-1179

[71] Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA (2004) Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90(1-5):187-193

[72] Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Zmuda JM, Stone KL, Hochberg MC, Cummings SR (2005) Bone mineral density and the risk of incident nonspinal in black and white women. *JAMA* 4;293(17):2102-2108

[73] Leslie WD, Lentle WD (2006) Race/ethnicity and fracture risk assessment: an issue that is more than skin deep. *J Clin Densitom* 9(4):406-412

[74] Villa ML (1994) Cultural determinants of skeletal health: the need to consider both race and ethnicity in bone research. *J Bone Miner Res* 9(9):1329-1332

Tables**Table 1.** Characteristics of the 146 patients studied.

Characteristic	
African derived n (%)	84 (57.53)
European derived n (%)	62 (42.47)
Age, years, mean (range)	59 (50-65)
Years since Menopause, yrs, mean (range)	11 (2-27)
Body Mass Index (BMI), mean (range)	26.24 (18.37 – 41.65)
Obesity n (%)	
Present	87 (59.58)
Absent	59 (40.42)
Smoking n (%)	
Smoking duration, yrs, mean (range)	20 (5 - 45)
Bone Mineral Density (g/cm²), mean (range)	
Femoral neck	0.739 (0.482 - 0.987)
Total hip	0.828 (0.518 – 1.182)
Lumbar spine	0.768 (0.484 - 0.923)
Site of Osteoporosis *n (%)	
Femoral neck	26 (17.8)
Total hip	16 (10.96)
Lumbar spine	142 (97.26)
Osteoporotic fractures n (%)	
Present	9 (6.16)
Absent	137 (93.84)
Serum level Vitamin D n (%)	
Low serum level of 25(OH)D	89 (60.95)
Vitamin D insufficiency	21 (14.38)
Vitamin D deficiency	68 (45.58)
Treatment n (%)	
Vitamin D supplementation	54 (36.98)
Calcium supplementation	45 (30.82)
Bisphosphonates	49 (33.56)

* Some patients had osteoporosis in more than one site

Table 2. TagSNPs of VDR gene used in this study.

(rs)	Mutation	Site	TagSNPs Validated		
			MAF CEU	MAF YRI	ASSAY ID
rs11168268	A>G	Intron	40%	27%	C_30742489_10
rs1540339	C>T	Intron	40%	17%	C_8716064_1
rs3890733	C>T	Intron	35%	11%	C_2880800_10

Table 3. Distribution of alleles and genotypes of the TagSNPs on the VDR gene in patients and controls.

Polymorphism	Patients n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value
rs11168268				
Allele	140	92		
A	159 (57%)	113 (61%)		
G	121 (43%)	71 (39%)		
Genotype				
AA	48 (34.28%)	35 (38.04%)	1.00	0.550
AG	63 (45%)	43 (46.74%)	1.07 (0.60-1.91)	
GG	29 (20.72%)	14 (15.22%)	1.51 (0.70-3.27)	
rs1540339				
Allele	142	84		
C	204 (72%)	119 (71%)		
T	80 (28%)	49 (29%)		
Genotype				
CC	73 (51.41%)	41 (48.81%)	1.00	0.890
CT	58 (40.85%)	37 (44.05%)	0.88 (0.50-1.55)	
TT	11 (7.74%)	6 (7.14%)	1.03 (0.35-2.99)	
rs3890733				
Allele	141	88		
C	197 (70%)	126 (72)		
T	85 (30%)	50 (28%)		
Genotype				
CC	74 (52.48%)	47 (53.41%)	1.00	0.840
CT	49 (34.75%)	32 (36.36%)	0.97 (0.55-1.73)	
TT	18 (12.77%)	9 (10.23%)	1.27 (0.53-3.03)	

OR = Odds Ratio, CI= 95% Confidence Interval, p-value

Table 4. Results of rs3890733 SNP (C>T) in a codominant and recessive model for age.

Genetic Model	Patients > 60 years n=50 n (%)	Patients < 60 years n=91 n(%)	OR,CI and p
Codominant			
C/C	29(58%)	45(49.5%)	OR=1
C/T	19(38%)	30(33%)	OR=1.02,CI=0.49-2.13
T/T	02(4%)	16(17.5%)	OR=5.16,CI=1.10-24.10, p=0.043^a
Recessive			
C/C + C/T	48(96%)	75(82.4%)	OR=1
T/T	02(4%)	16(17.6%)	OR=5.12,CI=1.13-23.20, p=0.012^a

OR = Odds Ratio, CI= 95% Confidence Interval, p-value, ^a Statistically significant p-value.

Table 5. Results of rs11168268 SNP (A>G) in a codominant and dominant model for BMD at total hip.

Genetic Model	Patients n=139	me	se	OR	CI and <i>p</i>
Codominant					
A/A	48(35)	0.82	0.013	0	
A/G	62(45)	85.53	36.64	84.7	CI=-13.59-183
G/G	29(20)	152.41	71.71	151.59	CI=31.33-271.80, <i>p</i>=0.042^a
Dominant					
A/A	48(34)	0.82	0.01	0	
A/G + G	91(66)	106.84	33.77	106.02	CI=14.70-197.30, <i>p</i>=0.024^a

me = mean, se = standard error, OR = Odds Ratio, CI= 95% Confidence Interval,^a Statistically significant *p*-value.

Table 6. Results of rs1540339 SNP (C>T) in a codominant and recessive model for ethnic group.

Genetic Model	European-derived Patients n=59 n (%)	African-derived Patients n=83 n(%)	OR,CI and <i>p</i>
Codominant			
C/C	25(42.4)	48(57.8)	OR=1
C/T	26(44.1)	32(38.6)	OR=0.64,CI=0.32-1.30
T/T	08(13.5)	03(3.6)	OR=0.20,CI=0.05-0.80, <i>p</i>=0.043^a
Recessive			
C/C + C/T	51(86.4)	80(96.4)	OR=1
T/T	08(13.6)	03(3.6)	OR=0.24,CI=0.06-0.94, <i>p</i>=0.029^a

OR = Odds Ratio, CI= 95% Confidence Interval,a Statistically significant p-value.

Supplementary Data. List of the assessed VDR Tag SNPs.

rs3890733	rs1540339	rs11168268
rs11168293	rs2239181	rs9729
rs2853564	rs2239179	rs3847987
rs2853559	rs886441	rs739837
rs4334089	Total: 3	rs731236 (Taq-I)
rs3890734		rs7975232 (Apa-I)
rs11168292		rs1544410 (Bsm-I)
Total: 6		rs2525044
		rs7962898
		rs7963776
		rs4760733
		rs7967152
		rs2239184
		rs7971418
		rs7975128
		rs7305032
		rs11168266
		Total: 16

Figures

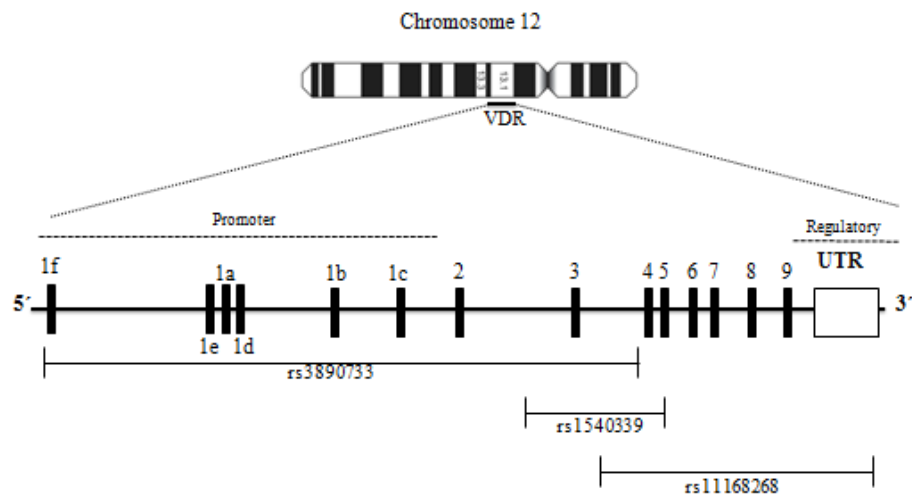


Figure 1. VDR chromosome structure and TagSNPs distribution throughout the gene.

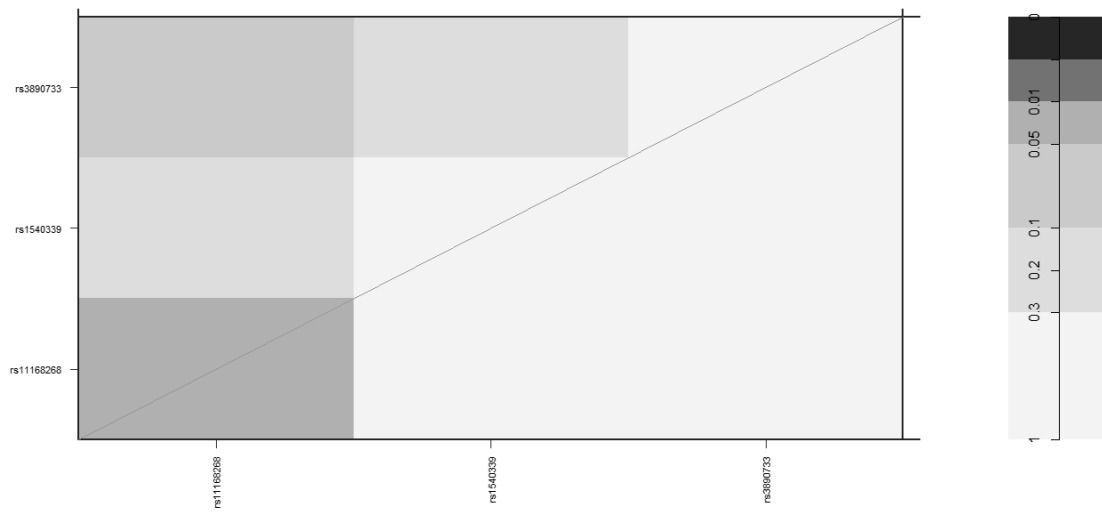


Figure 2. SNP-SNP interactions plot generated by SNPAssoc. This representative plot shows the significance levels of gene-gene interactions and spine BMD in the codominant model.

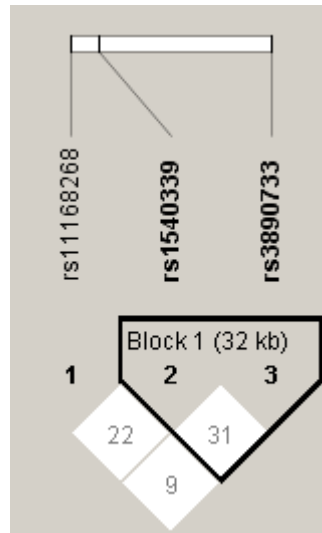


Figure 3. No linkage disequilibrium among the VDR gene SNPs was found to be associated with osteoporosis.

CONCLUSÕES FINAIS

1. Não foi observada a associação entre os TagSNPs rs11168268 (A>G), rs1540339(C>T), rs3890733(C>T) localizados no gene VDR e a osteoporose pós-menopausa ou susceptibilidade para o seu desenvolvimento na população de Recife /PE.
2. Não foi encontrada associação entre os TagSNPs rs11168268 (A>G), rs1540339(C>T), rs3890733(C>T) e os níveis de vitamina D, IMC, fraturas, menopausa, tabagismo ou uso de medicamentos na população de Recife /PE.
3. Entre as pacientes osteoporóticas:
 - foi observada associação entre o TagSNP rs11168268 (A>G) e DMO de fêmur total, configurando um fator atenuante da perda óssea em quadril na população de Recife /PE.
 - foi observada associação entre o TagSNP rs1540339(C>T) e o grupo de descendentes de europeus, configurado um fator protetor para o desenvolvimento de osteoporose neste grupo étnico na população de Recife /PE.
 - foi observada associação entre o TagSNP rs3890733(C>T) e mulheres pós-menopausadas abaixo de 60 anos de idade, configurando um fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose pós-menopausa nesta faixa etária na população de Recife /PE.
4. A associação desses TagSNPs do gene VDR com DMO de fêmur total, etnia e idade entre as mulheres pós-menopausadas, sugere a modulação genética da doença osteoporótica.

5. ANEXO - Aprovação do comitê de ética em pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n - 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 254/2012 - CEP/CCS

Recife, 26 de abril de 2012

Ao
Mestrando Alexandre Domingues Barbosa
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Registro do SISNEP FR - 481959
CAAE - 0506.0.172.172-11
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 513/11
Título: Produções Título: Polimorfismo do gene codificante do receptor da vitamina D(VDR): Associação com a susceptibilidade à osteoporose pós-menopausa e gravidade da doença

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 25 de abril 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE