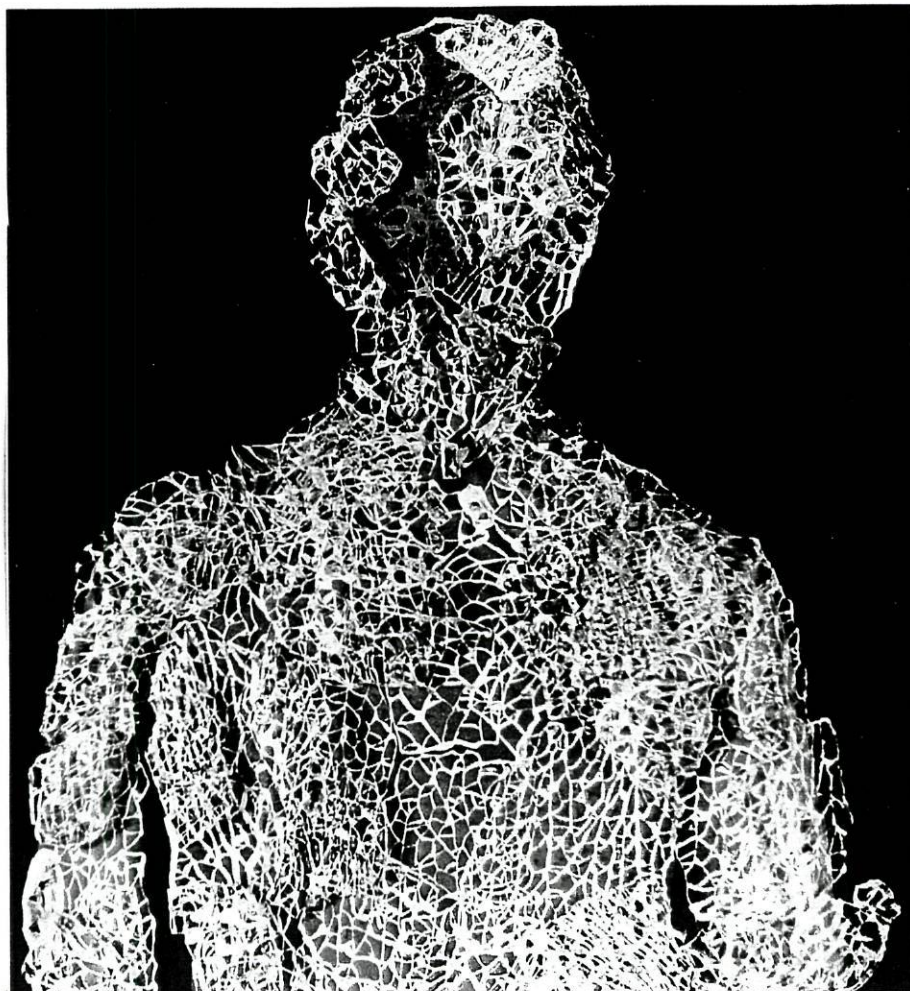


Genética da Osteoporose Pós-menopausica

Estudo dos polimorfismos Sp1 do COLIA 1,
PvuII do ER α , *FokI* e *BsmI* do VDR



JOSÉ MIGUEL ANDRADE DE OLIVEIRA BERNARDES

MESTRADO DE MEDICINA MOLECULAR
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

2001-2003

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre
apresentada à Faculdade de Medicina
da
Universidade do Porto

Artigo 48º, § 3º- A faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto-
Decreto Lei nº 19337, de 29 de Janeiro de 1931).

Ao Professor Manuel Sobrinho Simões, coordenador do Mestrado de Medicina Molecular e Director do IPATIMUP, quero exprimir o meu agradecimento pelo seu contributo para a minha formação científica em Biologia Molecular.

Aos Professores António Lopes Vaz e Francisco Ventura, quero manifestar o meu sincero agradecimento pelo estímulo e orientação durante este trabalho.

À Dr.^a Helena Alves e à Dr.^a Ana Pires do Centro de Histocompatibilidade do Norte, quero agradecer toda a disponibilidade e apoio prestados na realização do trabalho laboratorial.

À Professora Clara Sambade o meu agradecimento pelo seu entusiasmo e apoio na realização desta tese de mestrado.

ÍNDICE

Resumo	1
Summary	3
Introdução	5
1.Osteoporose – Definição e diagnóstico	5
2.Epidemiologia e importância clínica da Osteoporose	7
3.Factores de risco da Osteoporose	8
4.Osteoporose e susceptibilidade genética	9
Objectivos	16
Material e métodos	17
1.População estudada	17
2.Avaliação clínica	17
3.Avaliação analítica	18
4.Avaliação da massa óssea	18
5.Estudo genético	19
6.Análise estatística	23
Resultados	24
1.Polimorfismo <i>BalI</i> do gene COL1A1	24
2.Polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR	27
3.Polimorfismo <i>BsmI</i> do gene VDR	29
4.Polimorfismo <i>PvuII</i> do gene ER α	31
Discussão	34
1.Polimorfismo <i>BalI</i> do gene COL1A1	34
2.Polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR	35
3.Polimorfismo <i>BsmI</i> do gene VDR	37
4.Polimorfismo <i>PvuII</i> do gene ER α	38
5.Polimorfismos e metabolismo ósseo	40
Conclusões	41
Referências	42

RESUMO

A osteoporose é uma afecção comum e estima-se que cerca de 80% da sua variação deve-se a factores genéticos. Recentemente, vários polimorfismos têm sido implicados na etiopatogenia da osteoporose pós-menopausica, nomeadamente: polimorfismo da região de ligação do factor de transcrição Sp1 do gene do colagénio tipo I α 1 (COLIA 1), polimorfismos *FokI* e *BsmI* do gene do receptor da vitamina D (VDR) e polimorfismo *PvuII* do gene do receptor de estrogénios tipo α (ER α). Na população portuguesa, são escassos os dados relativos à frequência destes polimorfismos e da sua influência na massa óssea e/ou metabolismo ósseo.

O objectivo do trabalho foi analisar a associação dos quatro polimorfismos descritos com a presença de osteoporose e/ou osteopenia, a densidade mineral óssea, os parâmetros da ultrassonografia do calcâneo e os biomarcadores de metabolismo ósseo; numa população de mulheres saudáveis, pós-menopausicas.

Os quatro polimorfismos foram pesquisados por análise de RFLP's, utilizando ADN obtido de sangue periférico. Os polimorfismos do gene VDR foram determinados utilizando as enzimas de restrição *FokI*, sendo o alelo *F* caracterizado pela ausência do sítio de corte e o alelo *f* pela sua presença, e *BsmI*, com o alelo *B* reportando-se à ausência do sítio de restrição e o alelo *b* à sua presença. Os genótipos do gene ER α eram reconhecidos (alelo *p*) ou não (alelo *P*) pela enzima de restrição *PvuII*. O alelo *s*, contrariamente ao alelo *S*, continha a substituição G \rightarrow T ao nível do local de ligação do factor de transcrição Sp1 do gene COLIA 1, sendo submetido ao corte pela enzima de restrição *BalI*.

A densidade mineral óssea em diferentes localizações anatómicas (coluna lombar, triângulo de Ward, cólo do fémur e fémur proximal) foi determinada por densitometria óssea bifotónica (LUNAR Expert 1320). Os parâmetros de ultrassonografia do calcâneo foram avaliados com o aparelho Osteometer DTU-one.

Os biomarcadores de remodelação óssea quantificados foram: PTH, osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e telopeptídeos carboxi-terminais do colagénio tipo I séricos; desoxipiridinolina e telopeptídeos amino-terminais do colagénio tipo I urinários.

Na nossa população de 114 mulheres pós-menopausicas, com idade de $60,17 \pm 10,52$ anos, identificámos uma frequência significativamente maior do genótipo *Ss* no grupo osteopénico, por critérios densitométricos, e nos grupos osteopénico e osteoporótico, após a aplicação dos critérios de Frost aos parâmetros da ultrassonografia quantitativa do calcâneo. O genótipo *Ss* associou-se a valores de massa óssea significativamente mais baixos em todas as localizações anatómicas avaliadas.

Os genótipos *FF* e *Ff* foram mais prevalentes na população osteopénica. O genótipo *ff* associou-se a valores significativamente mais elevados de massa óssea ao nível da coluna lombar, fémur e calcâneo.

O polimorfismo *BsmI* do gene *VDR* não revelou diferenças na distribuição genotípica entre as populações osteopénica e não osteopénica, nem entre os grupos osteoporótico e não osteoporótico. A presença do alelo *B* associou-se a valores mais baixos de massa óssea.

Relativamente ao polimorfismo *PvuII* do gene *ER α* , obtivemos resultados díspares em diferentes localizações anatómicas, em termos de massa óssea.

Não se encontrou nenhuma associação entre os polimorfismos analisados e o perfil de biomarcadores de remodelação óssea.

Para a população portuguesa avaliada, o polimorfismo *Sp1* do gene do *COLIA 1* parece ter vantagem relativa na avaliação do risco individual para desenvolvimento futuro de osteopenia e/ou osteoporose.

SUMMARY

Osteoporosis is a common disorder and up to 80% of its variance is under genetic control. Several genetic polymorphisms are implicated in the pathogenesis of osteoporosis, in postmenopausal women. These include the Sp1 polymorphism of the collagen type I α 1 (COLIA 1) gene, the *FokI* and *BsmI* polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene, and the *PvuII* polymorphism of the estrogen receptor α (ER α) gene. Information about their role as determinants of bone mass and bone turnover in Portuguese populations is limited.

The aim of this work was to study the association between those several polymorphisms and the occurrence of osteoporosis and/or osteopenia, bone mineral density, ultrasound bone mass and bone turnover, in healthy postmenopausal women.

We determined the several polymorphisms using polymerase chain reaction-based restriction analysis of genomic DNA, extracted from peripheral blood samples. The VDR gene polymorphisms were detected by the restriction enzymes *FokI*, where the *F* allele characterized the absence of the cuttable site and the *f* allele its presence, and *BsmI*, where the *B* allele indicated the absence of the cuttable site and the *b* allele its presence. ER α genotypes were based on the presence (*p* allele) or absence (*P* allele) of the *PvuII* restriction site. The *S* allele signified the absence of the G \rightarrow T substitution at the binding site of the transcription factor Sp1 at the COLIA1 gene and consequently the lack of the *BalI* restriction site, whereas *s* allele indicated its presence.

Bone mineral density was determined by dual X-ray Absorptiometry (LUNAR Expert 1320), at lumbar spine, Wards triangle, femoral neck and proximal femur. Calcaneal ultrasound parameters were evaluated with an Osteometer DTU-one device.

Biochemical markers of bone turnover (serum PTH, osteocalcin, β -CTX, bone alkaline phosphatase and urinary deoxypyridinoline and cross-linked N-telopeptides of type I collagen) were measured.

In a population of 114 healthy postmenopausal Portuguese women (aged: 60,17 \pm 10,52), we observed a significantly higher *Ss* genotype frequency among the osteopenic group, according dual X-ray Absorptiometry parameters and WHO criteria. Considering Frost criteria, we verified a greater prevalence of the *Ss* genotype in the osteopenic and osteoporotic groups, according ultrasound parameters. *Ss* genotype was significantly associated with lower bone mass at different skeletal localizations.

FF and *Ff* genotypes were more prevalent among the osteopenic population. The *ff* genotype presented as significantly related with the highest lumbar, femoral and calcaneal bone mass.

BsmI VDR polymorphism showed no differences in the genotype distribution between osteopenic and non-osteopenic groups, nor between osteoporotic and non-osteoporotic populations. The presence of *B* allele was associated with lower bone mass.

Relatively to the ER α polymorphism, we obtained antagonistic results, in what concerns to bone mass at different skeletal localizations.

We didn't found any significant association between bone metabolism profile and the several studied polymorphisms.

In this Portuguese population, the COL1A1 Sp1 polymorphism seems to have some relative advantage in assessing the individual risk for developing osteopenia and/or osteoporosis in the future.

INTRODUÇÃO

1. OSTEOPOROSE - DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu osteoporose como sendo uma doença sistémica do esqueleto, caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da micro-arquitectura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e tendência à ocorrência de fracturas.

A osteoporose traduz fundamentalmente uma resistência óssea comprometida. A resistência do osso depende da densidade mineral óssea (quantificada por densitometria), da taxa de remodelação óssea (avaliada pelo doseamento de biomarcadores, séricos e urinários, do metabolismo ósseo) e da micro-arquitectura do osso.

As alterações da micro-arquitectura óssea, no caso particular da osteoporose vertebral, devem-se a uma diminuição da espessura das trabéculas ósseas horizontais e das conexões entre elas, condicionando conseqüentemente uma perda de resistência do osso. Actualmente, as alterações na micro-arquitectura óssea podem ser documentadas por tomografia tridimensional micro-computorizada.

Classicamente, o diagnóstico de osteoporose era efectuado por histomorfometria do tecido ósseo, obtido por biópsia óssea. Actualmente e desde 1994, o diagnóstico de osteoporose é densitométrico e baseado no valor de *score T* para a coluna vertebral e/ou fémur proximal, segundo os critérios da OMS. O *score T* diz respeito ao número de desvios-padrão do valor de densidade mineral óssea do doente, quando comparado com o valor médio de densidade mineral óssea duma população adulta e jovem, do mesmo sexo e etnia. Assim, classificam-se como normais os indivíduos com *score T* entre -1.0 e 1.0 (inclusivé), como osteopénicos aqueles com *score T* entre -1.0 e -2.5 e osteoporóticos, quando os valores são menores ou iguais a -2.5. Sabe-se que uma diminuição de cerca de um desvio-padrão no valor de DMO se traduz num risco de evento fracturário duplo a quádruplo.

A ultrassonografia é uma técnica recente para avaliar massa óssea ao nível do esqueleto periférico. Esta técnica, pelo facto de utilizar uma onda mecânica, é definida, por alguns autores, como tendo a capacidade de traduzir quantitativamente não apenas a massa óssea, mas também a elasticidade e micro-arquitectura do osso.

A ultrassonografia do calcâneo tem particular interesse, uma vez que este osso é predominantemente trabecular e é muito acessível à avaliação. Além disso, esta técnica não utiliza radiação, é de baixo custo e constitui um bom método de avaliação de risco de fractura, particularmente em idosos. Os parâmetros ultrassónicos ao nível do calcâneo, nomeadamente o *broad ultrasound attenuation* (BUA), parecem discriminar os doentes dos controlos, tão bem quanto a densitometria óssea. Alguns autores propuseram que valores elevados de BUA

traduziriam preferencialmente uma massa óssea aumentada e que, por sua vez, valores altos de SOS (*speed of sound*), outro parâmetro ultrassónico, estariam mais relacionados com uma boa conectividade do osso cortical do calcâneo. Estes conceitos ainda hoje são controversos.

Nos estudos EPIDOS e SOF (89 e 90), a diminuição de um desvio-padrão no valor de BUA traduziu-se numa duplicação do risco de fractura da anca, sendo esta associação independente do valor da densidade mineral óssea. Frost e colaboradores, utilizando o aparelho Osteometer DTU-one® para o calcâneo, demonstraram que um valor de *score T* $\leq -1,8$ era aquele que incluía o maior número de indivíduos classificados como osteoporóticos pelo método densitométrico, no entanto a maioria dos autores utiliza como limites de *score T* dos parâmetros ultrassónicos os mesmos da densitometria óssea (88). Assim, dado que não estão padronizados os valores de *score T*, para os parâmetros ultrassónicos do calcâneo, que definem as subpopulações de risco (osteopénica e osteoporótica), esta técnica não está ainda contemplada na definição actual de osteoporose.

Os marcadores bioquímicos de metabolismo ósseo têm vindo a ser usados no diagnóstico de osteoporose, fornecendo informação complementar relativa à taxa de remodelação óssea, e na avaliação precoce da resposta à terapêutica.

Os biomarcadores séricos habitualmente utilizados como marcadores de formação óssea são a osteocalcina e a fosfatase alcalina óssea. A osteocalcina é produzida pelos osteoblastos, sendo a segunda proteína mais abundante na matriz óssea (o colagénio é a mais abundante).

Como indicadores de reabsorção óssea são usados os produtos da degradação do colagénio tipo I como são os telopeptídeos carboxi-terminais do colagénio tipo I (β -CTX) no soro, os telopeptídeos amino-terminais do colagénio tipo I (U-NTx) na urina e o doseamento urinário de desoxipiridinolina (U-Dpyr).

Estes marcadores apresentam grande variabilidade circadiana, com um pico nocturno, e sazonal, com aumento dos marcadores de reabsorção óssea durante a época Outono/ Inverno. Adicionalmente, eles exibem grande variabilidade inter-individual por influências de idade, sexo, factores genéticos e hormonais, condição física, estilo de vida, etnia e características antropométricas.

No estudo EPIDOS, os marcadores de reabsorção óssea, mas não os de formação, revelaram-se preditores do risco de fractura na osteoporose pós-menopausica e senil (91). Estes marcadores de reabsorção óssea parecem ser úteis na avaliação do risco fracturário em doentes em que, nem os dados densitométricos, nem os clínicos, são suficientes para corroborar a necessidade de tratar.

Idealmente, devem avaliar-se um marcador de formação e outro de reabsorção ósseas, antes de iniciar qualquer terapêutica da osteoporose e 3 a 6 meses após a sua instituição.

2.EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA OSTEOPOROSE

A prevalência de osteoporose, segundo o estudo EVOS (87), foi estimada na ordem dos 25,0% a nível da coluna lombar e de 29,2% a nível femural, em mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. Neste estudo multicêntrico europeu é de realçar a representação da população portuguesa através de uma amostra proveniente da cidade do Porto. Nos EUA, estima-se que 70% das mulheres com idade igual ou superior a 80 anos são osteoporóticas (94).

O impacto clínico e sócio-económico da osteoporose deve-se à morbilidade e mortalidade associadas à ocorrência de fracturas, nomeadamente ao nível do colo do fémur, vértebras e punho.

As fracturas osteoporóticas do colo do fémur são aquelas com maior impacto em termos de saúde pública e aquelas em que os dados epidemiológicos são mais fidedignos, uma vez que exigem necessariamente internamento hospitalar prolongado. Um trabalho efectuado na cidade do Porto, em 1986 e para o sexo feminino, revelou um tempo médio de internamento de 33,8 dias e uma taxa de mortalidade de 11,3% nos doentes com este tipo de fractura e tratados conservadoramente, enquanto os intervencionados cirurgicamente exibiram um tempo médio de internamento de 23,8 dias e uma taxa de mortalidade de 11,8% (93). Estudos internacionais referem que a fractura do colo do fémur reduz a esperança de vida feminina em 9.2 anos/ 1000 mulheres (92).

No estudo MEDOS (86), que visava estudar a incidência de fracturas do colo do fémur em países da Europa do Sul, verificou-se uma incidência em Portugal superior à da Itália e da Turquia.

As fracturas osteoporóticas vertebrais têm também importância clínica, pois estão associadas a dorsolombalgias agudas e crónicas (condicionando um marcado absentismo laboral), alterações da qualidade de vida com maior ou menor grau de incapacidade física, risco aumentado de novas fracturas vertebrais (6 a 7 vezes superior) e do colo do fémur (2 vezes superior). Na amostra portuguesa do estudo EVOS (87) verificou-se uma prevalência de deformidades vertebrais (resultantes de fracturas vertebrais) de 13,5%.

As fracturas de Colles (da extremidade distal do antebraço), embora causem uma menor morbilidade que as da anca, podem ter complicações importantes, nomeadamente: deformação incapacitante do punho, síndrome do túnel cárpico, luxação radio-cubital, osteoartrose radiocárpica de aparecimento tardio e algodistrofia da mão.

Em suma, com base em diversos estudos epidemiológicos dos EUA e da Europa, podemos afirmar que uma mulher de raça branca tem uma probabilidade global de cerca de 40% de sofrer uma qualquer fractura osteoporótica (17,5% de fractura do colo do fémur, 15,6% de fracturas vertebrais sintomáticas e 16% para a fractura de Colles).

3.FACTORES DE RISCO DA OSTEOPOROSE

Actualmente considera-se a osteoporose como uma doença de etiologia multifactorial, em que determinados factores genéticos são modulados por factores hormonais, nutricionais e ambientais. A osteoporose pode ainda resultar da coexistência de outras doenças crónicas ou ser secundária ao uso prolongado de determinados fármacos.

Neste contexto, é possível definir a existência de duas categorias de factores de risco para osteoporose, alguns inalteráveis e outros mutáveis. Assim, os factores de risco: sexo feminino, idade avançada, raça caucasiana, menarca tardia, menopausa precoce, nuliparidade, gestação única, história familiar de osteoporose e/ou de fracturas osteoporóticas, são considerados factores de risco imutáveis. O índice de massa corporal (Peso/Altura^2) é parcialmente mutável dada a possível variação do peso corporal.

Por outro lado, um baixo teor de cálcio na dieta, pouca exposição solar, imobilização prolongada, sedentarismo, hábitos tabágicos ou etílicos marcados, ingestão excessiva de café, constituem factores de risco potencialmente modificáveis, em que é possível intervir preventivamente, reduzindo o risco de osteoporose.

Em relação à ocorrência de fracturas, são de salientar os seguintes factores de risco independentes: factores genéticos, baixa massa óssea, risco aumentado de quedas, estatura mais elevada e maior comprimento do eixo do colo do fémur (factor de risco documentado de fractura do colo do fémur).

4.OSTEOPOROSE E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

Em diversos estudos tem sido analisada a contribuição de factores genéticos na determinação da densidade mineral óssea, modulando, quer a aquisição do pico de massa óssea, quer o ritmo de perda da mesma com a idade.

Estudos familiares, incluindo análise de diferenças entre pares de gémeos mono e dizigóticos, têm evidenciado a importância dos factores genéticos na regulação da densidade mineral óssea e de outras características fenotípicas determinantes do risco de fractura (1). Estudos com gémeos demonstraram uma maior concordância nos valores de densidade mineral óssea em pares de gémeos monozigóticos que em dizigóticos, fundamentando a dominância da influência genética (2, 3, 13, 14, 28-32). Note-se que, na interpretação dos estudos em gémeos, admite-se como pressuposto que os factores ambientais importantes na determinação desta variabilidade fenotípica são igualmente semelhantes nos monozigóticos e nos dizigóticos, o que é questionável segundo alguns autores (33).

Por outro lado, outros estudos verificaram a existência de menor densidade mineral óssea e maior risco de fractura, após a menopausa, em filhas de mulheres osteoporóticas (26 e 27). A história familiar de fractura do colo do fémur constitui, por si só, um factor de risco para a ocorrência de fracturas, independentemente do valor da densidade mineral óssea (1, 8, 10 e 11).

A heritabilidade (contribuição do património genético para a manifestação de determinada característica fenotípica) da densidade mineral óssea está estimada entre 70 a 85%, a nível lombar e do fémur proximal; rondando os 50 a 60% ao nível do punho (1, 2, 3 e 4). Pocock e colaboradores mostraram que a contribuição de factores genéticos era maior nas áreas do esqueleto com predomínio de osso trabecular, ou seja, ao nível da coluna lombar e do triângulo de Ward (ao nível do fémur proximal) (3).

No que concerne à perda de massa óssea com a idade, o consenso em relação à contribuição de factores genéticos é menor. Alguns estudos prospectivos, em mulheres pós-menopáusicas, revelaram que a maior parte da perda de massa óssea do esqueleto axial não era explicável por factores ambientais (12). Um estudo com gémeos corroborou estas conclusões (13). No entanto, Christian e colaboradores não demonstraram qualquer evidência de efeito genético na perda de massa óssea, ao nível do rádio, e com a idade, em gémeos do sexo masculino (14).

A heritabilidade do evento fracturário é da ordem dos 25 a 35% de acordo com estudos em gémeos e familiares. Esta menor influência genética no risco de fractura deve-se à maior importância relativa de outros factores, nomeadamente os de susceptibilidade à ocorrência de quedas (1, 8 e 9).

Para outros determinantes de risco de fractura, tais como os parâmetros da ultrassonografia quantitativa do calcâneo, o comprimento do eixo longitudinal e outros aspectos da geometria do colo do fêmur; foi estimada uma heritabilidade na ordem dos 65% a 85% (2, 5, 6 e 7).

Outros factores determinantes do risco de osteoporose, como o índice de massa corporal, as idades da menarca e menopausa, são significativamente modulados por factores genéticos.

Marcadores séricos, associados ao metabolismo fosfo-cálcico, também apresentam valores de heritabilidade considerável, da ordem de 60 a 65% para a paratormona e 1.25 (OH)₂ vitamina D e de 74% para a fosfatase alcalina óssea específica do osso (8). Um estudo em gémeos adultos mostrou que a maior parte da variação dos níveis de osteocalcina sérica é também determinada por factores genéticos (34). Apesar de estudos de metabolismo ósseo em gémeos sugerirem uma grande contribuição dos factores genéticos para a taxa de remodelação óssea, esta influência é mais limitada no período pós-menopausa (35 e 36).

4.1. GENES / POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À OSTEOPOROSE

A identificação de genes/polimorfismos associados à osteoporose tem sido efectuada através dos estudos clássicos de *linkage* (em humanos ou animais) e análise mutacional em genes candidatos. Os estudos de *linkage* em animais comportam a grande desvantagem de os genes que influenciam a densidade mineral óssea nesses animais não serem necessariamente os mesmos que no homem.

4.1.1. Estudos de *linkage*

Os estudos de *linkage* em humanos utilizando famílias numerosas com várias gerações, permitiram identificar os genes associados a várias doenças ósseas metabólicas (tabela I).As fracturas por fragilidade óssea são uma característica proeminente de algumas destas doenças ósseas raras, como são os casos da *osteogenesis imperfecta* (causada por mutações no colagénio tipo I) ou o síndrome osteoporose-pseudoglioma (associado a mutações no gene LRP-5).

Tabela 1

Loci e genes identificados em doenças ósseas metabólicas

Doença óssea metabólica	Locus	Gene
Picnodisostose	1q21	Catepsina K
Osteopetrose/ Acidose tubular renal	8q22	Anidrase carbónica II
Doença de Camurati Engelmann	9q13	TGF β 1
Osteopetrose (forma autossómica recessiva)	11q12	TCIRG1
Osteoporose-pseudoglioma	11q12	LPR-5
Osteopetrose (forma autossómica recessiva)	16p13	CLCN7
Osteopetrose (forma autossómica dominante)	16p13	CLCN7
Esclerosteose/ Doença de Van Buchem	17q12	SOST

Muitos dos genes identificados nas doenças do metabolismo ósseo contribuem para a regulação da densidade mineral óssea na população normal, sendo naturalmente genes candidatos no estudo genético da osteoporose. Neste contexto, verificou-se que a região cromossómica 11q12-13, que contem os genes LRP-5 e TCIRG1, está relacionada com a densidade mineral óssea (17) e em algumas famílias está associada a massa óssea elevada com um padrão de transmissão autossómico dominante (23).

A osteoporose só muito raramente é que tem uma hereditariedade mendeliana simples, contudo já foram descritos duas famílias com osteoporose familiar (24 e 25), com mutações nos genes da aromatase e do receptor de estrogénios- α (ER α) respectivamente.

Outros estudos de *linkage* têm sido aplicados na identificação de loci associados a determinadas características fenotípicas como é o caso da densidade mineral óssea (tabela II) e determinados parâmetros da geometria do fémur. Estas regiões são designadas por *quantitative trait loci* (QTL)

Tabela II-

QTL para densidade mineral óssea

Referência	População	Locus	LOD score	Gene
Devoto et al. (18)	Pares de irmãos	1p36	3.51	DMO da anca
		2p23	2.29	DMO da anca
		4q33	2.95	DMO da anca
Niu et al. (19)	Pares de irmãos	2p21	2.15	DMO do punho
Koller et al. (20)	Pares de irmãos	1q21	3.86	DMO lombar
		5q33-35	2.23	DMO da anca
		6p11-12	2.13	DMO lombar
		11q12-13	2.16	DMO da anca

Num estudo envolvendo 115 probandos e 499 familiares, recorrendo a marcadores polimórficos na vizinhança de 23 genes potencialmente determinantes da densidade mineral óssea, obtêve-se o valor mais elevado de *LOD score* (2.7-3.5) no locus do receptor da paratormona tipo 1 (PTHr1). Os loci do receptor da Vitamina D (VDR), colagénio tipo I (COLIA1) e factor de crescimento epidérmico (EGF) também apresentaram *LOD scores* positivos ($\geq 1.7-1.8$) (22).

Por outro lado, Koller e colaboradores identificaram múltiplos loci associados a diferentes geometrias do fémur: locus 5q e comprimento do eixo longitudinal do cólo do fémur - *LOD score* 4.3; locus 4q e eixo longitudinal do colo do fémur / largura do 1/3 médio do fémur - *LOD score*: 3.9 e 3.5, respectivamente; 17q e largura da cabeça do fémur - *LOD score* 3.6) (21).

4.1.2. Genes candidatos

Os genes candidatos para a osteoporose, e portanto os primeiros genes analisados como genes de susceptibilidade, são aqueles que codificam proteínas com efeitos biológicos conhecidos em termos de metabolismo ósseo, condicionando a actividade de diferentes células do tecido ósseo. Alguns desses genes estão enumerados na tabela III.

Tabela III

Genes cuja relação com a massa óssea já foi estudada.

Categoria	Gene candidato
Receptores e hormonas calciotrópicas	VDR ERα/β PTH PTHRI Receptor da calcitonina Receptor dos glucocorticóides Receptor sensível ao cálcio
Vias metabólicas e enzimáticas	Aromatase Metaloproteínas
Receptores, citoquinas e factores de crescimento	TGF β -1 IGF-1 IL-6 IL-1 β IL-1RA TNFR2 OPG BMP-4
Matriz óssea	COLIA1 Osteocalcina Colagenase α HS2 glicoproteína
Outros	Apolipoproteína E MTHFR P57 Kip HLA PPAR γ Gene da helicase de Werner

A maioria dos estudos populacionais ou caso-controlo pretende correlacionar determinadas variantes alélicas e/ou genóticas (polimorfismos) com a densidade mineral óssea, a qualidade do osso, e a ocorrência de osteoporose (1). Por exemplo, vários trabalhos documentam que polimorfismos do gene TGF β 1 estão associados quer aos valores de densidade mineral óssea, quer à ocorrência de fracturas osteoporóticas (15 e 16). O polimorfismo do local de ligação do factor de transcrição Sp1 ao gene do colagénio tipo 1 (COLIA1), além de condicionar a massa óssea, determina também a qualidade do osso (35).

Contudo, os resultados destes estudos nem sempre são concordantes, chegando por vezes a serem contraditórios. Isto deve-se ao facto da associação de determinado polimorfismo genético a determinado fenótipo numa dada população, não ser necessariamente extrapolável a todas as outras.

Assim, a distribuição genotípica dos diversos polimorfismos pode variar de acordo com a população estudada; como é o caso do polimorfismo do local de ligação do factor de transcrição Sp1 do gene COL1A1, inexistente em algumas populações asiáticas (35).

Mesmo numa determinada população específica, a análise de polimorfismos pode criar vários problemas na interpretação dos resultados, quer pela presença de confundidores, quer pela má estratificação fenotípica da população.

O facto de um gene se associar significativamente aos valores de densidade mineral óssea, não implica necessariamente a existência de uma relação causal entre o gene e o fenótipo observado. Essa associação pode resultar de um desequilíbrio de *linkage* do gene polimórfico com o verdadeiro gene causal, situado na proximidade do primeiro. O desequilíbrio de *linkage* diz respeito ao fenómeno de dois genes muito próximos (afastados em média de 60 a 350 kb) serem herdados conjuntamente numa geração para a seguinte (1).

Por outro lado, na avaliação de uma característica fenotípica, há sempre que considerar as interacções de múltiplos genes com o ambiente. Assim, é possível que indivíduos, sem qualquer “predisposição genética” para osteoporose, apresentem um fenótipo osteoporótico condicionado apenas por factores ambientais, ou seja, fenocópias (26). Por outro lado, indivíduos com um ou mais alelos de risco para osteoporose, podem nunca vir a desenvolver a doença por penetrância incompleta desses genes na presença de um ambiente favorável ou “protector”.

Um exemplo particular da interacção entre factores genéticos e ambientais corresponde ao aumento de massa óssea do colo do fémur secundário ao uso de suplementos de Vitamina D, que é variável de acordo com os polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (VDR)

De igual modo, as diferenças de densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausicas em função dos polimorfismos do gene do receptor de estrogénios $-\alpha$ (ER α), só são significativas nas mulheres sem terapêutica hormonal de substituição (35).

4.1.3. Implicações clínicas do estudo de polimorfismos

O resultado da investigação da contribuição de factores genéticos para a densidade mineral óssea e portanto para a osteoporose, é consistente com o papel de múltiplos genes de susceptibilidade que actuam em idades diferentes, cada um com um efeito modesto na determinação da massa óssea. Alguns dos genes afectam fundamentalmente na fase de aquisição do pico de massa óssea, outros influenciam mais o ritmo de perda de massa óssea com a idade.

Apesar desta complexidade, o estudo de polimorfismos relacionados com a densidade mineral óssea e portanto com risco de osteoporose e de fractura , reveste-se de importância clínica por vários motivos:

- a) Os polimorfismos identificados parecem constituir marcadores sensíveis do risco individual de desenvolver fracturas osteoporóticas, uma vez que o valor de score $T \leq -2.5$ na densitometria óssea só identifica uma pequena fracção dos indivíduos que fracturam.
- b) A sua utilização, como preditores do risco de osteoporose e de fracturas osteoporóticas, será importante numa estratégia de medicina preventiva mais eficaz, identificando os indivíduos mais susceptíveis.
- c) A caracterização molecular pode ter importância farmacogenética, quer na identificação de novos alvos terapêuticos, quer na individualização da estratégia terapêutica (ex. diferenciação dos respondedores e resistentes a determinados fármacos ou identificação dos mais propensos à ocorrência de efeitos laterais) (1).

OBJECTIVOS

Neste trabalho pretendemos avaliar o papel de quatro polimorfismos - *BalI* do gene do colagénio I α (*COL1A1*), *PvuII* do gene do receptor de estrogénios α (*ER α*), *FokI* e *BsmI* do gene do receptor da vitamina D (*VDR*) - como marcadores de susceptibilidade para osteoporose ou osteopenia, numa população de mulheres pós-menopausicas da área metropolitana do Porto. Para isso:

- Analisámos a distribuição genotípica dos quatro polimorfismos nos vários subgrupos de indivíduos, em particular nos osteoporótico e osteopénico, assim definidos com base em dois métodos de avaliação da massa óssea - densitometria óssea e ultrassonografia quantitativa do calcâneo.
- Relacionamos cada um dos polimorfismos individualmente com os valores de densidade mineral óssea, avaliada por densitometria, em diferentes localizações anatómicas e com os parâmetros da ultrassonografia do calcâneo.
- Caracterizámos o perfil de metabolismo ósseo associado a cada um dos genótipos, avaliado através de biomarcadores séricos e urinários.

MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra populacional analisada compreendeu mulheres pós-menopausicas, residentes na área metropolitana do Porto, referenciadas a partir da consulta de climatério do Serviço de Ginecologia de um Hospital Universitário, entre Janeiro de 2001 e Janeiro de 2002.

Foram excluídas as mulheres com os seguintes antecedentes :

- Ooforectomia bilateral ou menopausa natural antes dos 40 anos de idade;
- Doença reumatológica;
- Doença endócrina (ex. : Diabetes Mellitus, hipertiroidismo ou hiperparatiroidismo);
- Doença crónica não-controlada;
- Doença neoplásica actual ou prévia;
- Doença trombo-embólica (com / sem terapêutica anticoagulante);
- Insuficiência renal;
- Insuficiência hepática;
- Alcoolismo;
- Tabagismo;
- Toxicodependência;
- Imobilização prolongada;

-Uso de fármacos, com comprovada ou potencial influência no metabolismo ósseo, nomeadamente: suplementos de cálcio e/ou de vitamina D, bifosfonatos, calcitonina, terapêutica hormonal de substituição há mais de três meses, estatinas, corticosteróides, hormonas tireoideias, varfarina e anti-epilépticos.

2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nas mulheres pós-menopausicas incluídas, procurou-se obter informação detalhada, através da história clínica, relativa a idades da menarca e menopausa, história obstétrica, história familiar ou pessoal de osteoporose e de fracturas (vertebrais, do colo do fémur ou antebraço, em consequência de quedas de baixo impacto), medicação habitual, níveis de actividade física e ingestão de produtos lácteos.

Foi efectuado um exame físico cuidadoso, sendo o peso e a altura determinados, utilizando sempre os mesmos instrumentos de medida.

3. AVALIAÇÃO ANALÍTICA

Foi efectuada uma avaliação bioquímica, incluindo: função renal e hepática, níveis séricos de cálcio (total e ionizado), fósforo e fosfatase alcalina óssea. Esta última determinação foi obtida após aquecimento da amostra a 56° C durante 15 minutos.

O estudo hormonal, incluiu a determinação dos níveis séricos de FSH, PTH e das hormonas tireoideias (T3 e T4 livres, TSH). A PTH sérica foi determinada com o Nichols Advantage™ Chemiluminescence Intact Parathyroid Hormone Immunoassay; apresentando um coeficiente de variação inter-ensaio de 5% e tendo um limite de detecção de 1 ng/l.

No estudo da taxa de remodelação óssea, foram avaliados os seguintes biomarcadores: osteocalcina e telopeptídeos carboxi-terminais do colagénio tipo I (β -CTx), no soro; desoxipiridinolina (U-Dpyr) e telopeptídeos amino-terminais do colagénio tipo I (U-NTx), na urina. A osteocalcina sérica foi determinada com o Electrochemiluminescence Elecsys® N-MID Osteocalcin Immunoassay; apresentando um coeficiente de variação inter-ensaio de 5% e tendo um limite inferior de detecção de 0,5 ng/ml. A concentração de β -CTx no soro foi obtida com o Electrochemiluminescence Elecsys® β -CrossLaps/serum Immunoassay; apresentando um coeficiente de variação inter-ensaio de 5% e tendo um limite inferior de detecção de 0,01 ng/ml. Para o doseamento do U-NTx recorreu-se a um teste de ELISA - Osteomark® NTx Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay; em que a concentração de NTx foi obtida por espectrofotometria e expressa em nM de equivalentes de colagénio do osso por mM de creatinina por litro, apresentando um coeficiente de variação inter-ensaio de 3-5%. A determinação das concentrações de U-Dpyr foi conseguida com o Chemiluminescence ACS:180® DPD Immunoassay. Este teste apresentou um coeficiente de variação inter-ensaio de 7.7% e limite inferior de detecção de 2,1 ng/ml (5.0 nM). As concentrações foram expressas em nM de U-Dpyr por mM de creatinina por litro

As amostras de sangue e de urina foram obtidas de manhã e em jejum.

4. AVALIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA

A densidade mineral óssea foi determinada ao nível da coluna lombar, cólo do fémur, triângulo de Ward e fémur proximal por densitometria óssea bifotónica por Raios X (DXA). As medições foram efectuadas no aparelho LUNAR Expert 1320 e a densidade mineral óssea, foi registada, para cada uma das localizações anatómicas, em g/cm², sendo a precisão da medição de $\pm 0,010$ g/cm². A osteoporose foi definida de acordo com os critérios da OMS, ou seja, foram classificadas como osteoporóticas as mulheres com valores de densidade mineral

óssea igual ou inferior a -2,5 desvios-padrão do valor médio da densidade mineral óssea correspondente ao pico de massa óssea da população adulta e jovem (pré-menopausica) de referência para o mesmo sexo (*score T* ≤ -2,5). Foram classificadas como osteopénicas as mulheres com valores de *score T* compreendidos entre -2,5 e -1.

Além do *score T* e para cada localização, foi determinado o valor de *score Z*. Este último corresponde ao número de desvios-padrão da densidade mineral óssea do indivíduo avaliado, relativamente ao valor médio de densidade mineral óssea de uma população de referência de indivíduos do mesmo sexo e idade.

A avaliação da massa óssea pelo método ultrassónico quantitativo do calcâneo foi efectuada com o aparelho Osteometer DTU-one, utilizando uma solução de água e detergente como meio de acoplamento. Este aparelho permite a escolha da área do calcâneo a quantificar. Os dois parâmetros obtidos foram a atenuação do ultra-som pelo osso ou BUA (expresso em dB/MHz) e a velocidade de transmissão do som ou SOS (expresso em m/s). Tal como na densitometria óssea, para cada parâmetro medido, o aparelho fornecia os respectivos *scores T* e *Z* em relação às respectivas populações de referência: uma população do mesmo sexo e adulta jovem, no primeiro, e uma população do mesmo sexo e do mesmo grupo etário, no segundo. Todas as medições foram realizadas no calcâneo esquerdo. O coeficiente de variação inter-ensaio da BUA foi de 0,8 a 2,5% e o da SOS foi de 0,2 a 0,4%.

A densitometria óssea e a ultrassonografia quantitativa do calcâneo foram realizadas no mesmo dia, na maioria das situações.

5. ESTUDO GENÉTICO

A colheita de sangue para extracção de ADN foi realizada após obtenção de consentimento informado e de acordo com as directrizes do Conselho de Ética do nosso hospital.

O DNA foi obtido a partir dos leucócitos do sangue periférico, utilizando o método clássico de extracção - sal-clorofórmio -, conforme descrito por Mullenbach et al – 1989 .

Os polimorfismos foram determinados utilizando os métodos descritos previamente na literatura (37, 95, 96 e 97, respectivamente para 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4). Em todos os casos foi usada a técnica de RFLP's. Nesta técnica, o produto de amplificação do gene em causa, obtido por PCR (Polymerase Chain Reaction), é submetido à acção (corte) de diferentes enzimas de restrição específicas. A determinação dos pesos moleculares dos diferentes fragmentos de DNA obtidos (após a sua separação por electroforese em gel de agarose) permite identificar o polimorfismo em causa.

5.1. Polimorfismo *Bal* I do gene do colagénio I α (COLIA 1)

Com o objectivo de amplificar a zona do polimorfismo G \rightarrow T no sítio de ligação do factor de transcrição Sp1 no gene COLIA1, foi utilizado o par de *primers* com as seguintes sequências : *forward* ou COLIA 1: 5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3' e *reverse* ou COLIA 2: 5'-GTCCAGCCCTCATCCTGGCC-3'. Para obter as melhores condições de amplificação desta região com a Platinum Taq DNA Polymerase, as reacções de PCR foram efectuadas utilizando 50 ng de ADN genómico e 0.5 μ M de cada um dos primers, numa mistura contendo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 1x PCR Rxn Buffer (Invitrogen), perfazendo um volume final de 20 μ l em cada reacção. A reacção de amplificação decorreu no termociclador 9700 (Applied Biosystems), realizando-se 40 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, durante 3 minutos, antes do primeiro ciclo; desnaturação a 94°C, durante 50 segundos; *annealing* a 60-72°C, durante 10 segundos, aumentando 1°C por cada ciclo a partir de 60°C; extensão a 72°C, durante 15 segundos, e com uma extensão de 5 minutos a 72°C no último ciclo. Os produtos da PCR foram digeridos com a *Mls*I (*Ball*) de acordo com as indicações do fabricante (MBI Fermentas). Os fragmentos resultantes da digestão foram revelados, após electroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR reconhecidos pela enzima de restrição *Ball* correspondiam aos alelos *s* e resultaram numa banda de 246 bp, enquanto que os produtos sem o sítio de restrição correspondiam aos alelos *S* e constituíram uma banda de 264 bp.

5.2. Polimorfismo *Fok* I do gene do receptor da vitamina D (VDR)

Com o objectivo de amplificar o exão 2 do gene VDR utilizamos o seguinte par de *primers*: VDR2a: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' (sequência do *primer forward*) e VDR2b: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (sequência do *primer reverse*). Para obter as melhores condições de amplificação desta região com a Platinum Taq DNA Polymerase, as reacções de PCR foram efectuadas utilizando 50 ng de ADN genómico e 0.5 μ M de cada um dos primers numa mistura contendo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 1x PCR Rxn Buffer (Invitrogen), perfazendo um volume final de 20 μ l em cada reacção. A PCR decorreu no termociclador 9700 (Applied Biosystems), realizando-se 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, durante 7 minutos, antes do primeiro ciclo; desnaturação a 94°C, durante 45 segundos; *annealing* a 60°C, durante 45 segundos; extensão a 72°C, durante 45 segundos. Os produtos da PCR foram digeridos com a *Fok* I (Behringer Mannheim) de acordo com as indicações do fabricante. Os fragmentos resultantes da digestão foram revelados, após electroforese em gel de agarose. O produto de amplificação não

reconhecido pela *Fok* I apresentava 265 bp e foi designado por alelo *F*, enquanto que a presença do sítio de restrição da enzima (com a obtenção de duas bandas, uma de 196 bp e outra de 69 bp) foi denominada de alelo *f*.

5.3. Polimorfismo *Bsm* I do gene do receptor da vitamina D (VDR)

Para amplificar a sequência específica entre o exão 7 e o intrão 8 do gene VDR utilizamos o seguinte par de primers: VDR1a: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA -3' (sequência do primer forward) e VDR1b: 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG -3' (sequência do primer reverse). Para obter as melhores condições de amplificação desta região com a Platinum Taq DNA Polymerase, as reacções de PCR foram efectuadas utilizando 50 ng de ADN genómico e 0.5 μ M de cada um dos primers numa mistura contendo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 1x PCR Rxn Buffer (Invitrogen), perfazendo um volume final de 20 μ l em cada reacção. A PCR decorreu no termociclador 9700 (Applied Biosystems), realizando-se 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, durante 5 minutos, antes do primeiro ciclo; desnaturação a 94°C, durante 60 segundos; *annealing* a 57°C, durante 60 segundos; extensão a 72°C, durante 60 segundos, e com uma extensão de 5 minutos a 72°C no último ciclo. Os produtos da PCR foram digeridos com a *Mva*1269I (*Bsm* I) de acordo com as indicações do fabricante (MBI Fermentas). Os fragmentos resultantes da digestão foram revelados, após electroforese em gel de agarose. O produto de amplificação não reconhecido pela *Bsm* I apresentava 900 bp e foi designado por alelo *B*, enquanto que a presença do sítio de restrição da enzima (com a obtenção de duas bandas, uma de 700 bp e outra de 200 bp) foi denominada de alelo *b*.

5.4. Polimorfismo *Pvu* II do gene do receptor de estrogénios α (ER α)

Para a amplificação deste fragmento do gene ER α contendo o exão 2 e parte do intrão 1 utilizamos o seguinte par de primers: ER1: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC -3' (sequência do primer forward) e ER1: 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA -3' (sequência do primer reverse). Para obter as melhores condições de amplificação desta região com a Platinum Taq DNA Polymerase, as reacções de PCR foram efectuadas utilizando 50 ng de ADN genómico e 0.5 μ M de cada um dos primers numa mistura contendo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 1x PCR Rxn Buffer (Invitrogen), perfazendo um volume final de 20 μ l em cada reacção. A PCR

decorreu no termociclador 9700 (Applied Biosystems), realizando-se 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, durante 5 minutos, antes do primeiro ciclo; desnaturação a 94°C, durante 30 segundos; *annealing* a 60°C, durante 20 segundos; extensão a 72°C, durante 90 segundos, e com uma extensão de 10 minutos a 72°C no último ciclo. Os produtos da PCR foram digeridos com a *Pvu* II (Promega) de acordo com as indicações do fabricante. Os fragmentos resultantes da digestão foram revelados, após electroforese em gel de agarose. A presença do sítio de restrição da enzima condicionou o aparecimento de dois fragmentos, um de 850 bp e outro de 450 bp, e foi designada de alelo *p*.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL).

A normalidade das variáveis quantitativas foi avaliada através do teste não-paramétrico de Kolmogorov – Smirnov. Todas elas, com a excepção dos valores de NTx-U e Dpyr-U, apresentaram uma distribuição normal.

Comparámos as frequências de cada um dos genótipos (respeitantes a cada um dos polimorfismos estudados), nas populações osteopénica versus não osteopénica e osteoporótica versus não osteoporótica, pelo teste do Qui Quadrado (χ^2).

As associações dos diferentes genótipos com os valores dos biomarcadores séricos de remodelação óssea e dos scores Z dos parâmetros densitométricos e ultrassónicos, foram analisadas por regressão linear simples (*One –way analysis of variance*, ANOVA). A sua relação com os valores de NTx-U e Dpyr-U foi determinada com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

A associação dos diferentes genótipos com os valores absolutos dos parâmetros densitométricos e ultrassónicos, foi efectuada recorrendo ao modelo de Regressão Linear Múltipla, ajustando para a idade, anos de menopausa e índice de massa corporal.

RESULTADOS

Avaliámos 114 mulheres pós-menopausicas, com idade média de $60,17 \pm 10,52$ anos (idades compreendidas entre os 43 e os 83 anos) e com $14,34 \pm 11,41$ anos após a menopausa. A menarca tinha ocorrido, em média, aos $13,09 \pm 1,76$ anos de idade (entre os 9 e os 19 anos).

Nenhuma das mulheres avaliadas realizava exercício físico regular, embora todas referissem marcha diária com duração contínua superior a meia hora. Todas afirmaram ingerir produtos lácteos em quantidade abundante (mais de cinco vezes por semana). A maioria apresentava excesso de peso, com um índice de massa corporal médio de $27,19 \pm 4,37$ Kg/m².

Todas as 114 mulheres realizaram densitometria óssea, 102 concluíram o estudo analítico completo, mas apenas 58 foram avaliadas por ultrassonografia do calcâneo.

1. POLIMORFISMO *Bal I* DO GENE COLIA 1

Na Tabela 1 estão patentes as distribuições dos diferentes genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 na nossa população de mulheres pós-menopausicas.

A distribuição dos genótipos foi semelhante entre as populações osteoporótica e não osteoporótica, independentemente do método de medição da massa óssea. As mulheres com osteopenia, na densitometria óssea, apresentaram uma frequência do genótipo *SS* significativamente mais elevada ($p=0,004$), que as não osteopénicas. Contudo é de salientar a baixa frequência do genótipo *ss* nesta população (4,9%, 5/102).

Classificando as mulheres como osteopénicas e osteoporóticas segundo os critérios de Frost (88) para a ultrassonografia do calcâneo, as diferenças na distribuição genotípica entre osteoporóticas e não osteoporóticas e entre osteopénicas e não osteopénicas, foram tendencialmente significativas, com valores de $p = 0,061$ e $p = 0,057$, respectivamente.

		Genótipos do polimorfismo <i>BalI</i> do gene COLIA1			<i>p</i>
		<i>ss</i>	<i>Ss</i>	<i>SS</i>	
Densitometria óssea	Sem osteopenia	14% (3/22)	9% (2/22)	77% (17/22)	0,004
	Com osteopenia	2% (2/80)	43% (34/80)	55% (44/80)	
	Sem osteoporose	8% (4/53)	34% (18/53)	58% (31/53)	0,444
	Com osteoporose	2% (1/48)	38% (18/48)	60% (29/48)	
Método ultrassônico quantitativo do calcâneo	Sem osteopenia	17% (2/12)	8% (1/12)	75% (9/12)	0,057
	Com osteopenia	2% (1/46)	31% (14/46)	67% (31/46)	
	Sem osteoporose	9% (3/33)	21% (7/33)	70% (23/33)	0,232
	Com osteoporose	0%	32% (8/25)	68% (17/25)	
	Sem osteoporose *	12%(3/24)	17%(4/24)	71%(17/24)	0,061
	Com osteoporose *	0%	32%(11/34)	68%(23/34)	

Tabela 1 - Distribuição dos diferentes genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 nas populações osteopénica versus não osteopénica e osteoporótica versus não osteoporótica, definidas quer pelo método densitométrico quer pelo ultrassónico; (* definição de osteoporose segundo os critérios de Frost et al.), e sua significância, analisada pelo teste do χ^2 (nível de significância : $p < 0,05$)

Os valores médios de *score Z* de todos os parâmetros densitométricos avaliados mostraram-se significativamente diferentes nos vários genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1(Tabela 2). Assim, o genótipo *Ss* associou-se sistematicamente aos valores mais baixos de *score Z* ao nível lombar e femural, ou seja, quer ao nível de áreas com predomínio de osso cortical (cólo do fémur) quer de osso trabecular (coluna lombar e triângulo de Ward).

Os valores de *score Z* dos parâmetros ultrassónicos não diferiram significativamente entre os vários genótipos deste polimorfismo.

	Genótipos do polimorfismo <i>BalI</i> do gene COLIA1			<i>p</i>
	<i>ss</i>	<i>Ss</i>	<i>SS</i>	
<i>Score Z L1L4</i>	1,060 ± 1,716	-1,085 ± 1,222	-0,894 ± 0,989	0,001
<i>Score Z Cólo fémur</i>	0,560 ± 0,305	-0,601 ± 0,843	-0,366 ± 0,865	0,016
<i>Score Z Δ Ward</i>	0,720 ± 0,502	-0,715 ± 0,917	-0,445 ± 0,853	0,003
<i>Score Z Fémur total</i>	1,200 ± 0,930	-0,377 ± 0,934	-0,208 ± 0,842	0,001
<i>Score Z BUA</i>	0,730 ± 0,604	-0,805 ± 1,362	-0,621 ± 1,227	0,159
<i>Score Z SOS</i>	0,603 ± 0,235	-0,510 ± 1,186	-0,060 ± 1,058	0,201

Tabela 2– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 no que respeita aos valores de *score Z* dos parâmetros densitométricos e ultrassónicos, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

Em relação à densidade mineral óssea, o genótipo *Ss* também se associou significativamente aos valores mais baixos nas diferentes localizações anatómicas (Tabela 3). Esta associação não se verificou para o parâmetro ultrassônico BUA.

	Genótipos do polimorfismo <i>BalI</i> do gene COLIA1			<i>p</i>
	<i>ss</i>	<i>Ss</i>	<i>SS</i>	
DMO L1L4 (g/cm²)	1,128 ± 0,277	0,884 ± 0,172	0,912 ± 0,156	<0,001
DMO Cólo fêmur (g/cm²)	0,913 ± 0,099	0,777 ± 0,121	0,806 ± 0,173	<0,001
DMO Δ Ward (g/cm²)	0,783 ± 0,134	0,603 ± 0,149	0,649 ± 0,146	<0,001
DMO Fêmur total (g/cm²)	1,042 ± 0,177	0,860 ± 0,128	0,881 ± 0,138	<0,001
BUA (dB/MHz)	51,414 ± 10,907	43,392 ± 11,705	42,554 ± 9,848	0,002
SOS (m/s)	1553,951 ± 3,117	1539,138 ± 12,234	1542,650 ± 12,352	0,086

Tabela 3– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 no que respeita aos valores absolutos dos parâmetros densitométricos e ultrassônicos, analisadas por regressão linear múltipla (ajustando para as variáveis idade, anos de pós-menopausa e índice de massa corporal) (nível de significância : $p < 0,05$)

Não se encontraram diferenças significativas entre os diversos genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 e os níveis séricos de PTH, 25 (OH) vitamina D3 e de biomarcadores de remodelação óssea (Tabela 4). A análise de Kruskal-Wallis também não revelou diferenças significativas nas concentrações de Ntx-U e Dpyr-U, entre os genótipos.

	Genótipos do polimorfismo <i>BalI</i> do gene COLIA1			<i>p</i>
	<i>ss</i>	<i>Ss</i>	<i>SS</i>	
PTH (pg/ml)	28,800 ± 5,393	48,094 ± 23,630	43,283 ± 19,829	0,317
FA óssea (U7I)	29.000 ± 11,790	28,500 ± 15,375	29,360 ± 23,404	0,991
Osteocalcina (ng/ml)	24,633 ± 9,154	19,261 ± 10,604	19,372 ± 8,775	0,636
CTx (ng/ml)	0,343 ± 0,275	0,292 ± 0,212	0,308 ± 0,211	0,920
25 (OH) vit.D3 (ng/ml)	10,850 ± 3,323	15,307 ± 6,752	15,615 ± 9,100	0,736

Tabela 4 – Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BalI* do gene COLIA1 no que respeita aos níveis séricos dos biomarcadores de remodelação óssea, PTH e 25 (OH) vit.D3, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

2. POLIMORFISMO *FokI* DO GENE VDR

Relativamente ao polimorfismo *FokI* do gene VDR, observamos que a distribuição dos diferentes genótipos pelas populações osteoporótica e não osteoporótica, foi semelhante e independente do método de quantificação da massa óssea utilizado. Contudo, as mulheres que apresentavam osteopenia, segundo a densitometria óssea, tinham uma prevalência significativamente mais elevada dos genótipos *Ff* e *FF* que as não osteopénicas (Tabela 5).

		Genótipos do polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR			<i>p</i>
		<i>ff</i>	<i>Ff</i>	<i>FF</i>	
Densitometria óssea	Sem osteopenia	27% (6/22)	41% (9/22)	32% (7/22)	0,016
	Com osteopenia	6% (5/80)	45% (36/80)	49% (39/80)	
	Sem osteoporose	17% (9/53)	38% (20/53)	45% (24/53)	0,217
	Com osteoporose	6% (3/48)	48% (23/48)	46% (22/48)	
Método ultrassónico quantitativo do calcâneo	Sem osteopenia	16% (2/12)	42% (5/12)	42% (5/12)	0,955
	Com osteopenia	13% (6/45)	42% (19/45)	45% (20/45)	0,280
	Sem osteoporose	15% (5/33)	33% (11/33)	52% (17/33)	
	Com osteoporose	13% (3/24)	54% (13/24)	33% (8/24)	
	Sem osteoporose*	13% (3/24)	29% (7/24)	58% (14/24)	0,157
	Com osteoporose*	15% (5/33)	52% (17/33)	33% (11/33)	

Tabela 5 - Distribuição dos diferentes genótipos do polimorfismo *FokI* do gene VDR nas populações osteopénica versus não osteopénica e osteoporótica versus não osteoporótica, definidas quer pelo método densitométrico quer pelo ultrassónico (* definição de osteoporose segundo os critérios de Frost et al.), e sua significância, analisada pelo teste do χ^2 (nível de significância : $p < 0,05$)

A presença do alelo *F* (em homo ou heterozigotia) associou-se significativamente a valores mais baixos de *score Z* ao nível do fémur proximal (Tabela 6). Os valores de *score Z*, nas restantes localizações anatómicas, não foram significativamente diferentes entre os vários genótipos deste polimorfismo.

	Genótipos do polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR			<i>p</i>
	<i>ff</i>	<i>Ff</i>	<i>FF</i>	
<i>Score Z L1L4</i>	-0,391 ± 1,374	-0,991 ± 1,209	-0,834 ± 1,120	0,326
<i>Score Z C6lo f6mur</i>	-0,018 ± 0,643	-0,418 ± 0,939	-0,465 ± 0,813	0,297
<i>Score Z Δ Ward</i>	-0,200 ± 0,591	-0,491 ± 0,979	-0,536 ± 0,901	0,575
<i>Score Z F6mur total</i>	0,518 ± 0,988	-0,289 ± 0,936	-0,243 ± 0,823	0,026
<i>Score Z BUA</i>	-0,093 ± 1,535	-0,960 ± 1,134	-0,428 ± 1,209	0,098
<i>Score Z SOS</i>	0,462 ± 2,084	-0,251 ± 0,955	-0,060 ± 0,725	0,762

Tabela 6– Diferenças entre os v6rios gen6tipos do polimorfismo *FokI* do gene VDR no que respeita aos valores de *score Z* dos par6metros densitom6tricos e ultrass6nicos, analisadas por regress6o linear simples (ANOVA) (n6vel de signific6ncia : $p < 0,05$)

O gen6tipo *FF* associou-se significativamente a valores mais baixos de densidade mineral 6ssea na coluna lombar, c6lo do f6mur e tri6ngulo de Ward (Tabela 7). Relativamente 6 densidade mineral 6ssea do f6mur proximal e ao valor de BUA, encontr6mos valores mais baixos na popula6o heterozigota- *Ff*.

	Gen6tipos do polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR			<i>p</i>
	<i>ff</i>	<i>Ff</i>	<i>FF</i>	
DMO L1L4 (g/cm²)	1,015 ± 0,190	0,901 ± 0,177	0,901 ± 0,165	<0,001
DMO C6lo f6mur (g/cm²)	0,874 ± 0,113	0,808 ± 0,138	0,777 ± 0,175	<0,001
DMO Δ Ward (g/cm²)	0,688 ± 0,123	0,639 ± 0,151	0,626 ± 0,158	<0,001
DMO F6mur total (g/cm²)	1,012 ± 0,149	0,866 ± 0,131	0,870 ± 0,132	<0,001
BUA (dB/MHz)	47,556 ± 11,337	40,171 ± 9,750	45,037 ± 10,104	0,001
SOS (m/s)	1545,753 ± 21,738	1540,927 ± 11,345	1543,098 ± 9,114	0,211

Tabela 7– Diferenças entre os v6rios gen6tipos do polimorfismo *FokI* do gene VDR no que respeita aos valores absolutos dos par6metros densitom6tricos e ultrass6nicos, analisadas por regress6o linear m6ltipla (ajustando para as vari6veis idade, anos de p6s-menopausa e 6ndice de massa corporal) (n6vel de signific6ncia : $p < 0,05$)

N6o se encontraram diferenças significativas entre os v6rios gen6tipos do polimorfismo *FokI* do gene VDR nos n6veis s6ricos de PTH, 25 (OH) vitamina D3 e de biomarcadores de remodela6o 6ssea (Tabela 8). A an6lise de Kruskal-Wallis tamb6m n6o mostrou diferenças nas concentra6es de Ntx-U e Dpyr-U, entre os v6rios gen6tipos.

	Genótipos do polimorfismo <i>FokI</i> do gene VDR			<i>p</i>
	<i>ff</i>	<i>Ff</i>	<i>FF</i>	
PTH (pg/ml)	47,750 ± 26,522	43,815 ± 17,152	42,969 ± 23,051	0,855
FA óssea (U/l)	28,560 ± 19,184	27,500 ± 23,692	30,880 ± 19,533	0,851
Osteocalcina (ng/ml)	17,713 ± 7,152	21,762 ± 10,890	17,440 ± 7,435	0,213
CTx (ng/ml)	0,251 ± 0,154	0,330 ± 0,231	0,292 ± 0,210	0,627
25 (OH) vit.D3 (ng/ml)	14,288 ± 9,527	16,276 ± 9,484	14,453 ± 5,150	0,754

Tabela 8– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *FokI* do gene VDR no que respeita aos níveis séricos dos biomarcadores de remodelação óssea, PTH e 25 (OH) vit.D3, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

3. POLIMORFISMO *BsmI* DO GENE VDR

Relativamente ao polimorfismo *BsmI* do gene VDR, não constatamos quaisquer diferenças na distribuição genotípica, quer nas populações osteoporótica versus não osteoporótica, quer nas populações osteopénica versus não osteopénica, independentemente do método de quantificação da massa óssea (Tabela 9).

		Genótipos do polimorfismo <i>BsmI</i> do gene VDR			<i>p</i>
		<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	
Densitometria óssea	Sem osteopenia	41% (9/22)	32% (7/22)	27% (6/22)	0,328
	Com osteopenia	28% (23/81)	49% (40/81)	23% (18/81)	
	Sem osteoporose	30% (16/53)	47% (25/53)	23% (12/53)	0,999
	Com osteoporose	31% (15/49)	47% (23/49)	22% (11/49)	
Método ultrassónico quantitativo do calcâneo	Sem osteopenia	42% (5/12)	33% (4/12)	25% (3/12)	0,560
	Com osteopenia	26% (12/46)	46% (21/46)	28% (13/46)	
	Sem osteoporose	30% (10/33)	43% (14/33)	27% (9/33)	0,982
	Com osteoporose	28% (7/25)	44% (11/25)	28% (7/25)	
	Sem osteoporose*	38% (9/24)	33% (8/24)	29% (7/24)	0,391
	Com osteoporose*	24% (8/34)	50% (17/34)	26% (9/34)	

Tabela 9 - Distribuição dos diferentes genótipos do polimorfismo *BsmI* do gene VDR nas populações osteopénica versus não osteopénica e osteoporótica versus não osteoporótica, definidas quer pelo método densitométrico quer pelo ultrassónico (*definição de osteoporose segundo os critérios de Frost et al.), e sua significância, analisada pelo teste do χ^2 (nível de significância : $p < 0,05$)

De igual modo, não se demonstraram diferenças significativas entre os vários genótipos do polimorfismo *BsmI* do gene VDR e os valores dos *score Z* dos diferentes parâmetros densitométricos e ultrassônicos (Tabela 10).

	Genótipos do polimorfismo <i>Bsm I</i> do gene VDR			<i>p</i>
	<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	
<i>Score Z L1L4</i>	-0,703 ± 1,342	-1,008 ± 1,080	-0,785 ± 1,174	0,508
<i>Score Z Cóló fémur</i>	-0,197 ± 1,006	-0,505 ± 0,886	-0,520 ± 0,551	0,244
<i>Score Z Δ Ward</i>	-0,310 ± 1,028	-0,580 ± 0,936	-0,572 ± 0,626	0,397
<i>Score Z Fémur total</i>	0,028 ± 1,154	-0,311 ± 0,870	-0,275 ± 0,612	0,255
<i>Score Z BUA</i>	-0,189 ± 1,017	-1,060 ± 1,141	-0,338 ± 1,114	0,062
<i>Score Z SOS</i>	-0,252 ± 1,275	-0,102 ± 1,123	-0,067 ± 0,833	0,876

Tabela 10– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BsmI* do gene VDR no que respeita aos valores de *score Z* de parâmetros densitométricos e ultrassônicos, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

A presença de heterozigotia (genótipo *Bb*) associou-se significativamente aos valores mais baixos de densidade mineral óssea ao nível da coluna lombar, triângulo de Ward e fémur proximal (Tabela 11) e a valores mais baixos BUA

Relativamente à densidade mineral óssea do cólo do fémur, encontramos valores mais baixos associados ao genótipo *BB* ($p < 0,001$).

	Genótipos do polimorfismo <i>BsmI</i> do gene VDR			<i>p</i>
	<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	
DMO L1L4 (g/cm²)	0,932 ± 0,203	0,893 ± 0,165	0,924 ± 0,147	<0,001
DMO Cóló fémur (g/cm²)	0,810 ± 0,205	0,794 ± 0,140	0,794 ± 0,098	<0,001
DMO Δ Ward (g/cm²)	0,659 ± 0,172	0,625 ± 0,153	0,630 ± 0,116	<0,001
DMO Fémur total (g/cm²)	0,907 ± 0,164	0,862 ± 0,136	0,881 ± 0,105	<0,001
BUA (dB/MHz)	45,022 ± 9,868	40,065 ± 10,496	46,073 ± 9,995	0,001
SOS (m/S)	1541,511 ± 13,985	1542,939 ± 12,630	1542,713 ± 10,331	0,291

Tabela 11– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BsmI* do gene VDR no que respeita aos valores absolutos dos parâmetros densitométricos e ultrassônicos, analisadas por regressão linear múltipla (ajustando para as variáveis idade, anos de pós-menopausa e índice de massa corporal) (nível de significância : $p < 0,05$)

Os níveis séricos de PTH, 25 (OH) vitamina D3 e dos biomarcadores de remodelação óssea (Tabela 12) não foram significativamente diferentes entre os vários genótipos.

	Genótipos do polimorfismo Bsm I do gene VDR			<i>p</i>
	<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	
PTH (pg/ml)	45,150 ± 30,390	43,119 ± 13,915	43,856 ± 18,146	0,951
FA óssea (U/l)	29,320 ± 25,951	25,460 ± 17,871	34,810 ± 18,826	0,378
Osteocalcina (ng/ml)	19,868 ± 9,152	20,581 ± 8,001	17,350 ± 11,808	0,573
CTx (ng/ml)	0,308 ± 0,270	0,336 ± 0,183	0,241 ± 0,165	0,395
25 (OH) vit.D3 (ng/ml)	15,408 ± 9,027	15,438 ± 8,724	14,840 ± 6,163	0,981

Tabela 12– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *BsmI* do gene VDR no que respeita aos níveis séricos dos biomarcadores de remodelação óssea, PTH e 25 (OH) vit.D3, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

4. POLIMORFISMO *Pvu II* DO GENE $ER\alpha$

As frequências genótípicas do polimorfismo *PvuII* do gene $ER\alpha$, não apresentaram quaisquer diferenças significativas na sua distribuição, nas populações osteoporótica versus não osteoporótica e nas populações osteopénica versus não osteopénica Isto independentemente do método de quantificação da massa óssea utilizado (Tabela 13).

		Genótipos do polimorfismo <i>Pvu II</i> do gene $ER\alpha$			<i>p</i>
		<i>pp</i>	<i>Pp</i>	<i>PP</i>	
Densitometria óssea	Sem osteopenia	23% (5/22)	68% (15/22)	9% (2/22)	0,198
	Com osteopenia	34% (27/79)	47% (37/79)	19% (15/79)	
	Sem osteoporose	32% (17/53)	53% (28/53)	15% (8/53)	0,703
	Com osteoporose	28% (13/47)	51% (24/47)	21% (10/47)	
Método ultrassónico quantitativo do calcâneo	Sem osteopenia	25% (3/12)	67% (8/12)	8% (1/12)	0,446
	Com osteopenia	26% (12/46)	50% (23/46)	24% (11/46)	
	Sem osteoporose	27% (9/33)	61% (20/33)	12% (4/33)	0,173
	Com osteoporose	24% (6/25)	44% (11/25)	32% (8/25)	
	Sem osteoporose*	25% (6/24)	67% (16/24)	8% (2/24)	0,112
	Com osteoporose*	26% (9/34)	44% (15/34)	30% (10/34)	

Tabela 13 - Distribuição dos diferentes genótipos do polimorfismo *PvuII* do gene ER nas populações osteopénica versus não osteopénica e osteoporótica versus não osteoporótica, definidas quer pelo método densitométrico quer pelo ultrassónico (* osteoporose definida segundo os critérios de Frost et al.), e sua significância, analisada pelo teste do χ^2 (nível de significância : $p < 0,05$)

De igual modo, os valores de *score Z* dos diferentes parâmetros densitométricos e ultrassônicos (Tabela 14) não diferiram significativamente em função do genótipo.

	Genótipos do polimorfismo <i>PvuII</i> do gene <i>ERα</i>			<i>p</i>
	<i>pp</i>	<i>Pp</i>	<i>PP</i>	
<i>Score Z L1L4</i>	-0,811 ± 1,099	-0,823 ± 1,337	-0,912 ± 0,796	0,958
<i>Score Z Cólo fêmur</i>	-0,411 ± 0,732	-0,393 ± 0,920	-0,363 ± 0,929	0,983
<i>Score Z Δ Ward</i>	-0,515 ± 0,733	-0,431 ± 1,035	-0,481 ± 0,759	0,918
<i>Score Z Fêmur total</i>	-0,207 ± 0,890	-0,151 ± 0,958	-0,181 ± 0,794	0,964
<i>Score Z BUA</i>	-0,491 ± 1,275	-0,494 ± 1,149	-0,998 ± 1,575	0,505
<i>Score Z SOS</i>	0,088 ± 0,951	-0,205 ± 1,141	-0,256 ± 1,154	0,664

Tabela 14– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *PvuII* do gene *ERα* no que respeita aos valores de *score Z* dos parâmetros densitométricos e ultrassônicos, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

No entanto, o genótipo *pp* associou-se significativamente aos valores mais baixos de densidade mineral óssea ao nível do triângulo de Ward e fêmur proximal (Tabela 15). Ao nível do cólo do fêmur os valores de densidade mineral óssea foram mais baixos na presença do genótipo *Pp*. Por outro lado, os valores mais baixos de densidade mineral óssea lombar e de BUA, relacionaram-se significativamente com a presença de homozigotia *PP*.

	Genótipos do polimorfismo <i>PvuII</i> do gene <i>ERα</i>			<i>p</i>
	<i>pp</i>	<i>Pp</i>	<i>PP</i>	
DMO L1L4	0,911 ± 0,151	0,927 ± 0,199	0,899 ± 0,123	<0,001
DMO Cólo fêmur	0,801 ± 0,117	0,798 ± 0,185	0,819 ± 0,119	<0,001
DMO Δ Ward	0,630 ± 0,128	0,647 ± 0,171	0,650 ± 0,113	<0,001
DMO Fêmur total	0,874 ± 0,128	0,888 ± 0,144	0,893 ± 0,143	<0,001
BUA	43,242 ± 9,890	44,561 ± 9,916	39,730 ± 12,156	0,001
SOS	1543,323 ± 10,474	1542,834 ± 12,660	1540,178 ± 14,346	0,195

Tabela 15– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *PvuII* do gene *ERα* no que respeita aos valores absolutos dos parâmetros densitométricos e ultrassônicos, analisadas por regressão linear múltipla (ajustando para as variáveis idade, anos de pós-menopausa e índice de massa corporal) (nível de significância : $p < 0,05$)

Tal como para os outros polimorfismos analisados, os genótipos do polimorfismo *PvuII* do gene *ERα* não se relacionaram a valores significativamente diferentes de PTH, 25 (OH) vitamina D3 e de biomarcadores de remodelação óssea.(Tabela 16)

	Genótipos do polimorfismo <i>Pvu</i> II do gene <i>ERα</i>			<i>p</i>
	<i>pp</i>	<i>Pp</i>	<i>PP</i>	
PTH (pg/ml)	42,980 ± 16,999	42,206 ± 24,346	46,767 ± 10,460	0,805
FA óssea (U/l)	25,730 ± 17,854	27,120 ± 17,816	38,080 ± 29,330	0,218
Osteocalcina (ng/ml)	18,286 ± 9,761	20,369 ± 9,574	19,546 ± 8,820	0,789
CTx (ng/ml)	0,314 ± 0,206	0,308 ± 0,203	0,289 ± 0,256	0,952
25 (OH) vit.D3 (ng/ml)	16,775 ± 8,254	12,868 ± 6,550	19,356 ± 10,541	0,104

Tabela 16– Diferenças entre os vários genótipos do polimorfismo *Pvu*II do gene *ERα* no que respeita aos níveis séricos dos biomarcadores de remodelação óssea, PTH e 25 (OH) vit.D3, analisadas por regressão linear simples (ANOVA) (nível de significância : $p < 0,05$)

DISCUSSÃO

1. POLIMORFISMO *Bal I* DO GENE COLIA 1

Grant e colaboradores descreveram pela primeira vez a associação deste polimorfismo com a osteoporose (1 e 37). Este consiste na substituição G →T no local de ligação do factor de transcrição Sp1, no intrão 1 do gene COLIA1, correspondendo ao alelo *s* na análise por RFLP's. Mann e colaboradores demonstraram, em estudos funcionais utilizando culturas celulares de osteoblastos *Ss*, que o alelo *s* tem uma maior afinidade de ligação ao factor de transcrição Sp1, conduzindo a uma maior transcrição desse alelo (três vezes superior) nos indivíduos heterozigotos em relação aos homozigotos *SS* (38). Do aumento da transcrição resulta aumento do número de cadeias $\alpha 1$ do colagénio tipo I, com aumento da razão $\alpha 1/\alpha 2$, e da quantidade de homotrímeros $\alpha 1$, afectando conseqüentemente a qualidade da matriz óssea (38 e 43). Testes de biomecânica em fragmentos de osso humano, revelaram uma pior mineralização e uma menor resistência do osso nos indivíduos heterozigotos *Ss*, em comparação com os homozigotos *SS* (1 e 38).

Nos dois maiores estudos populacionais envolvendo mulheres pós-menopausicas, verificou-se que a presença do alelo *s* se associava a valores inferiores de densidade mineral óssea, quer a nível lombar (osso trabecular), quer do cólo do fémur (osso cortical), encontrando-se os valores mais baixos na população homozigótica *ss*. (35, 37 e 43). Um estudo de meta-análise pôs em evidência que, por influência do alelo *s*, ocorria diminuição do valor de densidade mineral óssea da ordem de 0.15 unidades de *score Z*, associada a um aumento do risco fracturário de 62% (1 e 38).

Por outro lado, um estudo em 220 mulheres pré-menopáusicas, apenas demonstrou associações fracas do polimorfismo *Bal I* do gene COLIA1 com a densidade mineral óssea lombar, do fémur proximal e do punho (44).

Neste contexto, a maioria dos autores considera que este polimorfismo tem maior influência no ritmo de perda de massa óssea com a idade, do que na aquisição do pico de massa óssea (35).

Curiosamente, este polimorfismo do COLIA1 constitui também um bom preditor da ocorrência de fracturas osteoporóticas, independente da densidade mineral óssea avaliada por densitometria (39). Pensa-se que este facto é devido à relação deste polimorfismo com outras características qualitativas do osso, melhor avaliadas por outras técnicas distintas da densitometria (35).

Relativamente à frequência do alelo *s*, sabe-se que existem diferenças étnicas marcadas: ele é mais frequente em caucasianos, sendo raro nas populações africanas e asiáticas (40).

Numa população de raça caucasiana a frequência dos genótipos *Ss* e *ss* é de cerca de 65% e 4%, respectivamente (35).

Na nossa amostra a frequência do genótipo *ss* foi também muito baixa (4,9%; 5/102).

Relativamente a este polimorfismo, os nossos resultados corroboram em parte os dados previamente descritos na literatura. Assim, o genótipo *Ss* foi mais frequente nas mulheres com osteopenia pelos critérios densitométricos e associou-se significativamente aos valores mais baixos de *score Z* e de densidade mineral óssea nas diferentes localizações anatómicas, quer em zonas de predomínio de osso trabecular, quer de osso cortical.

Paralelamente quando a massa óssea foi avaliada por ultrassonografia do calcâneo, a associação do genótipo *Ss* com a presença, quer de osteopenia, quer de osteoporose, esta última definida de acordo com os critérios recentes de Frost, alcançou quase significância estatística. Estes resultados parecem reforçar a hipótese de que a ultrassonografia do calcâneo, para além de avaliar aspectos quantitativos da massa óssea, também informa acerca da qualidade do osso. Aliás, conforme referido anteriormente, este polimorfismo associa-se a aspectos qualitativos do osso, independentes do valor da densidade mineral óssea.

2. POLIMORFISMO *Fok I* DO GENE VDR

O gene VDR foi um dos primeiros genes de susceptibilidade para a osteoporose a ser estudado. O polimorfismo *FokI* localiza-se no exão 2 do gene VDR e afecta o codão de iniciação da transcrição, condicionando a síntese de proteínas que diferem em três amino-ácidos e que apresentam actividade transcricional distinta (26, 81). Arai e colaboradores demonstraram que a forma mais curta do VDR (originária do alelo *F*) tem uma actividade transcricional 1.7 vezes superior à sua forma mais longa (originária do alelo *f*) (80). As duas isoformas apresentam uma interacção diferencial com o TFIIB (factor de transcrição que actua ao nível da região N-terminal do gene VDR), condicionando uma maior actividade transcricional do alelo *F* (82).

Curiosamente, um estudo realizado em crianças norte-americanas, revelou que os indivíduos com o genótipo *FF* exibiam uma absorção intestinal de cálcio 40% superior à dos homocigotos *ff* (79). Estes dados realçam a importância deste polimorfismo na regulação da homeostasia do cálcio (80)

Relativamente a este polimorfismo, sabe-se que existem diferenças étnicas importantes; o genótipo *ff* é duas vezes menos prevalente em populações de origem africana, quando comparadas com populações de origem caucasiana ou asiática(77).

Os vários estudos deste polimorfismo em mulheres pós-menopausicas, parecem apoiar a associação do genótipo *ff* com menor densidade mineral óssea nas várias localizações anatómicas. O primeiro trabalho, efectuado em mulheres americanas de origem hispânica, mostrou que o genótipo *ff* estava associado a valores de densidade mineral óssea lombar 13% inferiores aos do genótipo *FF* (72). Outros trabalhos, em mulheres pós-menopausicas de diversas nacionalidades (italiana, francesa e coreana) corroboraram estas observações, registando diferenças de densidade mineral óssea em várias localizações anatómicas, entre os genótipos, da ordem dos 13% a 6% (73, 74 e 75). Na população italiana, o genótipo *ff* associou-se a uma duplicação do risco de fracturas vertebrais (73). A variação dos valores da densidade mineral óssea em função do genótipo, nas populações caucasianas, era maior nos primeiros anos de menopausa, assistindo-se a um declínio progressivo dessa diferença com o tempo (73 e 74).

Na população masculina também se verificou a presença de menor densidade mineral óssea lombar nos indivíduos portadores genótipo *ff* (78).

Por outro lado, em mulheres afro-americanas não foi encontrada qualquer associação deste polimorfismo com a densidade mineral óssea (76), assim como em mulheres pré-menopausicas de diversas etnias (26).

Sumariamente, pode afirmar-se que a influência do polimorfismo *FokI* do gene *VDR* na densidade mineral óssea depende da etnia, da idade, dos anos pós-menopausa e da área do esqueleto avaliada (26).

Na nossa população de mulheres pós-menopausicas, encontrámos frequências dos genótipos *FF* e *ff*, 45% e 11% respectivamente, semelhantes às descritas em populações caucasianas (44% para o genótipo *FF* e 16% para o genótipo *ff*) (78).

Em contradição com a maioria dos trabalhos em mulheres caucasianas, documentámos uma forte associação do genótipo *ff* com valores mais elevados de massa óssea nas diferentes localizações anatómicas, incluindo o calcâneo. O *score z* da densidade mineral óssea do colo do fémur foi significativamente maior para este genótipo *ff*. O alelo *F*, em hetero ou homozigotia, foi mais frequente na população osteopénica por critérios densitométricos.

Estes resultados divergentes podem atribuir-se a vários factos:

a) a nossa amostra pode não ter a dimensão suficiente para demonstrar a real associação deste polimorfismo com a densidade mineral óssea;

b) as mulheres avaliadas tinham muitos anos pós-menopausa e este facto pode atenuar o relação deste polimorfismo com a massa óssea;

c) a população de mulheres do Norte de Portugal, que avaliámos, é reconhecidamente diferente, do ponto de vista genético, das restantes populações europeias (98), com a presença de haplogrupos africanos e muçulmanos. Este aspecto pode, por si só, justificar as diferenças do efeito deste polimorfismo em relação aos estudos em populações caucasianas.

3. POLIMORFISMO *Bsm* I DO GENE VDR

Este polimorfismo do gene VDR, afecta a extremidade 3' do gene, estando localizado no intrão 8. O seu efeito parece exercer-se através da sua influência na estabilidade do ARN mensageiro (26). Vários estudos revelaram a associação de variantes alélicas da extremidade 3' do gene VDR com diferentes comprimentos da sequência poli(A), região extremamente importante na estabilidade do ARN mensageiro. A presença do alelo *b* condiciona uma sequência poli (A) mais longa que a do alelo *B*, conferindo uma maior estabilidade ao RNA mensageiro (83, 84 e 85). No entanto, vários estudos falharam em demonstrar diferenças significativas na quantidade de proteína VDR produzida pelos diferentes genótipos deste polimorfismo (26).

Recentemente, duas meta-análises confirmaram a contribuição das variantes alélicas *Bsm* I do gene VDR na variação da densidade mineral óssea (63 e 64). Contudo os resultados dos estudos em mulheres pós-menopáusicas nem sempre têm sido concordantes em relação à influência deste polimorfismo. A maioria evidenciou uma associação do alelo *B* com valores mais baixos de densidade mineral óssea, a nível da coluna lombar e fémur proximal (53), alguns referindo diferenças de densidade mineral óssea da ordem dos 4% a 13% entre os genótipos *BB* e *bb* (26, 54, 55, 56, 57 e 58). Outros trabalhos, não revelaram qualquer relação entre este polimorfismo e a densidade mineral óssea (26). e outros ainda, mostraram uma associação inversa, ou seja, uma relação entre o genótipo *BB* e massa óssea mais elevada (26, 59, 60 e 61).

Este polimorfismo apresenta diferenças étnicas importantes; sendo o alelo *b* mais prevalente em populações asiáticas (75%) (26).

Na nossa população a prevalência do alelo *b* foi de 54%.

Por outro lado, encontrámos uma associação do alelo *B* semelhante à da maioria dos estudos, isto é, a sua presença em hetero ou homocigotia, associou-se aos valores mais baixos de densidade mineral óssea em diferentes localizações: cólo do fémur, triângulo de Ward e coluna lombar. Este resultado não foi ajustado para a ingestão diária de cálcio, uma vez que esta não foi rigorosamente quantificada, na nossa amostra.

O conhecimento da quantidade de cálcio da dieta é importante por interferir com o efeito deste polimorfismo (66, 67, 68 e 69). Dawson-Hughes e colaboradores, num estudo em mulheres pós-menopáusicas americanas, demonstraram que existia uma menor absorção intestinal de cálcio nos indivíduos com genótipo *BB* quando comparados com o genótipo *bb*, particularmente na presença de uma dieta pobre em cálcio. Estas mulheres, após enriquecimento da dieta em cálcio, deixaram de exibir esta diferença na absorção intestinal do cálcio (71). Paralelamente, um estudo prospectivo em jovens revelou que, com o aumento da ingestão diária de cálcio de 800 para 1700 mg, não se obtinham ganhos de densidade mineral óssea em indivíduos com o genótipo *bb*, ao contrário do que sucedia com os genótipos *BB* e *Bb* (70). Contudo, dois outros estudos independentes, contrariando o que seria de esperar, não encontraram qualquer associação entre estes genótipos e a densidade de VDR na mucosa intestinal (26).

Por outro lado, o genótipo *bb* associa-se a uma maior eficácia da terapêutica com suplementos de Vitamina D (65), o que pode explicar o facto de os caucasianos, com predomínio do alelo *B*, responderem menos a este tipo de suplementos que os asiáticos. Num estudo em idosos tratados com suplementos de cálcio e vitamina D, os indivíduos portadores do genótipo *BB* sofreram maior perda de densidade mineral óssea a nível lombar que os genótipos *Bb* e *bb* (67).

4. POLIMORFISMO *Pvu* II DO GENE *ERα*

O gene *ERα* é um gene candidato na osteoporose por condicionar a resposta óssea aos estrogénios.

Em termos funcionais o polimorfismo *PvuII*, localizado no intrão 1 do gene *ERα*, pode influenciar a resposta aos estrogénios por vários mecanismos. A ausência do sítio de restrição da *Pvu* II (alelo *P*) acarreta a desorganização dum local de reconhecimento (CAGCTG) para o factor de transcrição AP4, podendo regular, desta forma, a transcrição do gene *ERα* (49).

Por outro lado, este polimorfismo encontra-se em desequilíbrio de *linkage* com outros, nomeadamente o polimorfismo da zona de repetição (TA) localizada *upstream*, entre os promotores A e B do gene *ERα*. O numero variável de repetições pode condicionar o uso de um promotor em detrimento de outro, determinando a expressão de diferentes isoformas de *ERα* a nível tecidual (50 e 51). A presença de menos de 15 repetições TA (habitualmente associada ao alelo *p* em caucasianos), condiciona valores mais baixos de densidade mineral óssea lombar e um risco fracturário triplo (50)

No entanto, algumas discrepâncias encontradas na literatura, relativamente ao papel do polimorfismo do intrão 1 do gene $ER\alpha$, parecem dever-se ao facto deste polimorfismo não se relacionar da mesma forma com o número de repetições (TA) da região promotora do gene em populações de diferentes etnias (26), por diferentes graus de *linkage* entre os dois polimorfismos.

Relativamente à distribuição genotípica do polimorfismo *Pvu* II do gene $ER\alpha$ (26), não existe evidência de diferenças étnicas, estando descritas, para a população americana, prevalências do genótipos *PP*, *Pp* e *pp* de 29%, 53% e 18%, respectivamente.

Na maior parte dos trabalhos publicados na literatura, o genótipo *PP* está associado a valores mais baixos de densidade mineral óssea nas populações asiáticas e mais elevados nas caucasianas (26). Nas mulheres japonesas pós-menopausicas foi possível demonstrar a associação do genótipo *PP* não só com valores mais baixos de densidade mineral óssea, mas também com a presença de osteoporose (45 e 46). Esta associação foi corroborada noutros estudos, em mulheres pré-menopausicas, na Tailândia e no Reino Unido (47 e 49). Por outro lado, em mulheres americanas, pré e peri-menopáusicas, demonstrou-se uma forte associação do genótipo *PP* com valores mais elevados de densidade mineral óssea a nível lombar (48). Nas populações com origem belga, dinamarquesa, italiana e coreana (mulheres pré e pós-menopausicas) não se encontrou qualquer associação entre o polimorfismo *Pvu* II do gene $ER\alpha$ e a densidade mineral óssea (26).

Na nossa população as frequências dos genótipos *PP*, *Pp* e *pp* foram de 17%, 51% e 32%, respectivamente. O genótipo *PP* apresentou uma frequência inferior e o *pp* superior em relação a outras amostras da literatura .

Curiosamente, obtivemos resultados significativos na associação do genótipo *PP* a valores mais baixos de BUA e de densidade mineral óssea a nível lombar e, simultaneamente, com valores mais elevados de massa óssea ao nível do fémur; estes factos levantam a hipótese dum efeito preponderante de outros genes ou polimorfismos na determinação da massa óssea. Alguns desses genes podem influenciar a quantidade de estrogénios produzidos e desta forma ultrapassar os efeitos relacionados com as diferenças do $ER\alpha$, conforme já descrito na literatura (26).

5.POLIMORFISMOS E METABOLISMO ÓSSEO

Nas 102 mulheres, em que doseámos os biomarcadores de remodelação óssea, constatámos que cerca de 50% delas apresentavam níveis elevados dos marcadores de reabsorção óssea (β -CTx: 45%, U-Dpyr: 52%, U-NTx: 56%) e osteocalcina sérica normal. Onze mulheres apresentavam deficiência de vitamina D (25(OH)vit D3 <9 ng/ml).

Na nossa população, e para todos os polimorfismos analisados, não encontramos qualquer tipo de associação com os valores de biomarcadores de metabolismo ósseo ou de PTH.

Estes resultados podem estar na dependência do tamanho da amostra estudada, mas também podem dever-se ao facto, da avaliação, altamente variável, dos marcadores do metabolismo ósseo, traduzir o perfil metabólico num determinado momento e não necessariamente identificar a perturbação duradoura do metabolismo ósseo.

CONCLUSÕES

1. Os resultados da nossa análise dos polimorfismos *BalI* do gene *COL1A1*, *FokI* e *BsmI* do gene *VDR* e *PvuII* do gene *ER α* , reforçam a ideia de complexidade da influência genética na osteoporose. Apesar de cada um dos polimorfismos influenciar (de forma distinta) o valor da densidade mineral óssea, o seu efeito é modesto na determinação dos fenótipos osteopénico e osteoporótico.

2. Na nossa amostra, constituída por mulheres pós-menopausicas da região metropolitana do Porto, o polimorfismo que apresentou resultados mais consistentes em relação ao valor de massa óssea e que melhor identificou as sub-populações osteopénica e osteoporótica, foi o *Bal I* do gene *COL1A1*. A presença do genótipo *Ss* parece ser o melhor marcador de risco para osteopenia e osteoporose, sobretudo quando o diagnóstico é efectuado por ultrassonografia do calcâneo.

3. Nenhum dos genótipos analisados se associou a um padrão específico de remodelação óssea.

REFERÊNCIAS

1. Ralston SH: Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2460-2466, 2002.
2. Arden NK, Baker J, Hogg C et al.: The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res* 11: 530-534, 1996.
3. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL et al.: Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 80 : 706-710, 1987.
4. Gueguen R, Jouanny , Guillemin F et al.: Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 12: 2017-2022, 1995.
5. Kaprio J, Rimpela A, Winter T et al.: Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol* 67: 739-753, 1995.
6. Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD et al.: Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1875-1880, 1998.
7. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M et al.: The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int* 6: 178-182, 1996.
8. Deng HW, Chen WM, Recker S et al.: Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture. *J Bone Miner Res* 15: 1243-1252, 2000.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Spector TD et al.: Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people. *BMJ* 320: 1669-1670, 2000.
10. Torgerson DJ, Campbell MK, Thomas RE et al.: Prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors. *J Bone Miner Res* 11: 293-297, 1996.
11. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS et al.: Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 332: 767-773, 1995.

12. MacDonald HM, McGuigan FEA, New AS et al.: COL1A1 sp1 polymorphism predicts early peri-menopausal spinal bone loss. *J Bone Miner Res* 16: 1634-1641, 2001.
13. Kelly PJ, Nguyen T, Hopper J et al.: Changes in axial bone density with age: a twin study. *J Bone Miner Res* 8: 11-17, 1993.
14. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW et al.: Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 44: 429-433, 1989.
15. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J et al.: Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in post-menopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13: 1569-1576, 1998.
16. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK et al.: A sequence variation: 713-8 delC in the transforming growth factor- β 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 20: 289-294, 1997.
17. Koller DL, Rodriguez LA, Christian JC et al.: Linkage of a QTL contributing to normal variation in bone mineral density to chromosome 11q12-13. *J Bone Miner Res* 13: 1903-1908, 1999.
18. Devoto M, Shimoya K, Camini J et al.: First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur J Hum Genet* 6: 151-157, 1998.
19. Niu T, Chen C, Cordell H et al.: A genome-wide scan for loci linked to forearm bone mineral density. *Hum Genet* 104: 226-233, 1999.
20. Koller DL, Econs MJ, Morin PA et al.: Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3116-3120, 2000.
21. Koller DL, Liu G, Econs MJ et al.: Genome screen for quantitative trait loci underlying normal variation in femoral structure. *J Bone Miner Res* 16: 985-991, 2001.
22. Duncan EL, Brown MA, Sinsheimer J et al.: Suggestive linkage of the parathyroid receptor type 1 to osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14: 1993-1999, 2000.

23. Johnson ML, Gong G, Kimberling W et al.: Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet* 60: 1326-1332, 1997.
24. Smith EP, Boyod J, Frank GR et al.: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. *New Engl J Med* 331: 1056-1061, 1994.
25. Morishima A, Grumbach MM, Simpson Er et al.: Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3689-3698, 1995.
26. Gennari L, Becherini L, Falchetti A et al.: Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 81: 1-24, 2002.
27. Seeman E, Hopper JL, Bach La et al.: Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. . *New Engl J Med* 320: 554-558, 1989.
28. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ et al.: Genetic determinants of bone mass in adult women a reevaluation of the twin model and the potential importance of the gene interaction on heritability estimate. *J Bone Miner Res* 6: 561-567, 1991.
29. Flicker L, Hopper JL, Rodgers L et al.: Bone density in elderly women: a twin study. *J Bone Miner Res* 10: 1607-1613, 1995.
30. Arden NK, Spector TD: Genetic influences on muscle strength, lean body mass and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res* 12: 2076-2081, 1997.
31. Harris M, Nguyen TV, Howard JM et al.: Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone* 22: 141-145, 1998.
32. Hopper JL, Green RM, Nowson CA et al.: Genetic, common environment and individual-specific components of variance for bone mineral density in 10-26-year-old females: a twin study. *Am J Epidemiol* 147: 17-29, 1998.
33. Kelly PJ, Morrison NA, Sambrook PN et al.: Genetic influences on bone turnover, bone density and fractures. *Eur J Endocrinol* 133: 265-271, 1995.

34. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT et al.: Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 808-814, 1991.
35. Roux S: The genetics of osteoporosis. *Joint Bone Spine* 68: 482-486, 2001.
36. Garnero P, Arden NK, Griffiths G et al.: Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 140-146, 1996.
37. Grant SFA, Reid DM, Blake G et al.: Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 site in the collagen type I $\alpha 1$ gene. *Nat Genet* 14: 203-205, 1996.
38. Mann V, Hobson EE, Li B et al.: A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predispose to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 107: 899-907, 2001.
39. McGuigan Fe, Armbrecht G, Smith r et al.: Prediction of osteoporotic fractures by bone densitometry and COL1A1 genotyping: a prospective, population-based study in men and women. *Osteoporos Int* 12: 91-96, 2001.
40. Beavan S, Prentice A , Dibba b et al.: Polymorphism of the collagen type I $\alpha 1$ gene and ethnic differences in hip-fracture rates. *N Engl J Med* 339: 351-352, 1998.
41. Harris SS, Patel MS, Cole DE et al.: Associations of the collagen type I $\alpha 1$ Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. *Calcif Tissue Int* 66: 268-271, 2000.
42. Qureshi AM, McGuigan FE, seymour DG et al.: Association between COL1A1 Sp1 alleles and femoral neck geometry. *Calcif Tissue Int* 69: 67-72, 2001.
43. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q et al.: Relation of alleles of the collagen type I $\alpha 1$ gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 388: 1016-1021, 1998.
44. Garnero P, Borel O, Grant S et al.: Collagen I $\alpha 1$ Sp1 polymorphism, bone mass and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 13: 813-817, 1998.
45. Sano M, Inoue S, Hosoi T et al.: Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphisms with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commmun* 217: 378-383, 1995.

46. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T et al.: Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 11: 306-311, 1996.
47. Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S et al.: Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in pre-menopausal women but not in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 21: 487-493, 1998.
48. Willing M, Sowers M, Aron D et al.: Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 13: 695-705, 1998.
49. Albagha OME, McGuigan FEA, Red DM et al.: Estrogen receptor α gene polymorphism and bone mineral density: haplotype analysis in women from the UK. *J Bone Miner Res* 16: 128-134, 2001.
50. Becherini L, Gennari L, Masi L et al.: Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor α gene and their relationship to bone mass variation in post-menopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 12: 2043-2050, 2000.
51. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M et al.: TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic factors but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res* 15: 2222-2230, 2000.
52. Hassager C, Jensen SD, Christiansen C et al.: Non-responders to hormone replacement therapy for the prevention of post-menopausal bone loss: do they exist? *Osteoporos Int* 4: 36-41, 1994.
53. Morrison NA, Cheng JQI, Akifumi T et al.: Prediction of bone mineral density from Vitamin D receptor alleles. *Nature* 367: 284-287, 1994.
54. Gennari L, Becherini L, Masi 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* 83: 939-944, 1998.
55. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA et al.: Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in pre-menopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 11: 1003-1009, 1996.

56. Spector TD, Keen RW, Arden NK et al.: Influence of Vitamin D receptor genotype on bone mineral density in post-menopausal women: a twin study in Britain. *Br Med J* 310: 1357-1360, 1995.
57. Vandevyver C, Wyling T, Cassiman JJ et al.: Influence of Vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in post-menopausal women and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 12: 241-247, 1997.
58. Tamari M, Yokouchi M, Komiya S et al.: Correlation between Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density in Japanese patients with osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 60: 229-232, 1997.
59. Salamone LM, Ferrell R, Black DM et al.: The association between Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density at the spine, hip and whole body in premenopausal women. *Osteoporos Int* 6: 63-68, 1996.
60. Uitterlinden AG, Pols HAP, Burger H et al.: A large scale population-based study of the association of Vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res* 11: 1241-1248, 1996.
61. Houston LA, Grant SFA, Reid DM et al.: Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone* 18: 249-252, 1996.
62. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ 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* 89: 6665-6669, 1992.
63. Cooper GS, Umbach DM: Are Vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 11: 1841-1849, 1996.
64. Gong G, Stern HS, Cheng SC et al.: The association of bone mineral density with Vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int* 9: 55-64, 1999.
65. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H et al.: Interaction between the Vitamin D receptor gene and collagen type I $\alpha 1$ gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res* 16: 379-385, 2001.

66. Krall EA, Parry P, Lichter JB et al.: Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res* 10: 978-984, 1995.
67. Ferrari S, Rizzoli R, Chevallery T et al.: Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet* 345: 423-424, 1995.
68. Salamone LM, Glynn NW, Black DM et al.: Determinants of post-menopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. *J Bone Miner Res* 11: 1557-1565, 1996.
69. Kiel DP, Myers RH, Cupples LA et al.: The *BsmI* Vitamin D receptor restriction length polymorphism (*bb*) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res* 12: 1049-1057, 1997.
70. Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO 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* 13: 363-370, 1998.
71. Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S et al.: Calcium absorption on high and low calcium intake in relation to Vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3657-3661, 1995.
72. Gross C, Eccleshall TR, Mallory PJ 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 post-menopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 11: 1850-1855, 1996.
73. Gennari L, Becherini L, Mansani R et al.: *FokI* polymorphism at translation initiation site of the Vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in post-menopausal Italian women. *J Bone Miner Res* 14: 1379-1386, 1999.
74. Lucotte G, Mercier G, Burkel A et al.: The Vitamin D receptor *FokI* start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic post-menopausal French women. *Clin Genet* 56: 221-224, 1999.
75. Choi YM, Jun JK, Choe J et al.: Association of the Vitamin D receptor start codon polymorphism (*FokI*) with bone mineral density in post-menopausal Korean women. *J Hum Genet* 45: 280-283, 2000.

76. Zmuda JM, Cauley JA , Danielson ME et al.: Vitamin D receptor translation initiation polymorphism and markers of osteoporotic risk in older African-American women. *Osteoporos Int* 9: 214-219, 1999.
77. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C et al.: The Vitamin D receptor start codon polymorphism (*FokI*) and bone mineral density in pre-menopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 12: 1043-1048, 1997.
78. Kanan RM, Varanasi SS, Francis RM et al.: Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (*FokI*) and bone mineral density in healthy male subjects. *Clin Endocrinol* 53: 93-98, 2000.
79. Ames SK, Ellis KJ, Gunn SK et al.: Vitamin D receptor gene *FokI* polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J Bone Miner Res* 12: 915-921, 1997.
80. Arai H, Myamoto K, Taketani Y 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* 12: 915-921, 1997.
81. Collin EM, Weel AEAM; Uitterlinden AG et al.: Consequences of Vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1.25-dihydroxy-Vitamin D3. *clin Endocrinol* 52: 211-216, 2000.
82. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK et al.: The polymorphic N-terminus in human VitaminD receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 14: 401-420, 2000.
83. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA et al.: The nuclear Vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13: 325-349, 1998.
84. Ingles AS, Haile RW, Henderson BE et al.: Strength of linkage disequilibrium between two Vitamin D receptor in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 93-98, 1997.
85. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW et al.: Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear Vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 177: 145-159, 2001.

86. Elffors I, Allander E, Kanis JÁ et al.: The variable incidence of hip fracture in Southern Europe: the MEDOS study. *Osteoporosis Int* 4: 253-263, 1994.
87. Lunt M, Felsenberg D, Adams J et al.: Population-based geographic variations in DXA bone density in Europe: the EVOS study. *Osteoporosis Int* 7: 175-189, 1997.
88. Frost ML, Blake GM, Fogelman I et al.: Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporosis Int* 11: 321-330, 2000.
89. Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM et al.: Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet* 348 (9026): 511-514, 1996.
90. Black DM, Palermo L, Nevitt MC et al.: Comparison of methods for defining prevalent vertebral deformities: the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 10(6): 890-902, 1995.
91. Garnero P, Haugherr E, Chapuy MC et al.: Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *J Bone Miner Res* 11(10): 1531-1538, 1996.
92. Eiskjaer S, Ostgard SE, Jakobsen BW et al.: Years of potential life lost after hip fracture among postmenopausal women. *Acta Orthop Scand* 63: 293-296, 1992.
93. Aroso Dias A, Ferreira F, Quintal A et al.: Epidemiologia e custos das fracturas osteoporóticas em Portugal. *Rev Port Reumatol* 1: 26-35, 1990.
94. Melton LJ: Hip fractures: a worldwide problem today and tomorrow. *Bone* 14 (Suppl): 1-8, 1993.
95. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG et al.: Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 242: 1702-1705, 1988.
96. Carling T, Kindmark A, Hellman P et al.: Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat Med* 1: 1309-1911, 1995.
97. Yaich L, Dupont WD, Cavener DR et al.: Analysis of the *PvuII* restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res* 52: 77-83, 1992.

98. Pereira L, Prata MJ, Amorim A: Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann Hum Genet* 64(Pt 6): 491-506, 2000.