



ConScientiae Saúde

ISSN: 1677-1028

conscientiaesaude@uninove.br

Universidade Nove de Julho

Brasil

Lúcio Carvalho, Luiz Carlos; Pires Oliveira, Deise A. A.; Franco Oliveira, Rodrigo; Mara Maciel, Sandra; Poli-Frederico, Regina Célia  
Polimorfismo nos genes interleucina 1B e VDR relacionado à osteoporose em idosos: estudo piloto  
ConScientiae Saúde, vol. 10, núm. 3, 2011, pp. 409-415  
Universidade Nove de Julho  
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92920013001>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Polimorfismo nos genes interleucina 1B e VDR relacionado à osteoporose em idosos: estudo piloto

## *IL-1B and VDR gene polymorphism related to osteoporosis in the elderly: a pilot study*

Luiz Carlos Lúcio Carvalho<sup>1</sup>; Deise A. A. Pires Oliveira<sup>2</sup>; Rodrigo Franco Oliveira<sup>2</sup>; Sandra Mara Maciel<sup>3</sup>; Regina Célia Poli-Frederico<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mestrando em Ciências da Reabilitação – Unopar. Londrina, PR – Brasil.

<sup>2</sup> Docentes do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação/Laboratório de Biologia Molecular – Unopar. Londrina, PR – Brasil.

<sup>3</sup> Docente do Programa de Mestrado em Odontologia/Laboratório de Biologia Molecular – Unopar. Londrina, PR – Brasil.

### Endereço para correspondência

Regina Célia Poli-Frederico  
R. Marselha 183, Jardim Piza,  
86041-140 – Londrina – PR [Brasil]  
regina.frederico@unopar.br

### Local da pesquisa

Centro de Pesquisa em Saúde, Laboratório de  
Biologia Molecular, Unopar. Londrina, PR – Brasil.

### Resumo

**Introdução:** Fatores genéticos contribuem para o risco de osteoporose em idosos. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre polimorfismos nos genes: interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e receptor de vitamina D (VDR) em 41 idosos com e sem osteoporose provenientes de unidades básicas de saúde. **Métodos:** Foram extraídos os DNAs a partir de leucócitos do sangue periférico dos idosos. Os polimorfismos genéticos foram avaliados por meio da PCR-RFLP. O teste de  $\chi^2$  e o teste exato de Fischer foram usados para avaliar o efeito de cada polimorfismo na osteoporose, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Foi constatada uma associação significativa entre a presença de osteoporose e o polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$  em idosos. Para o gene VDR não foi verificada associação relevante. **Conclusões:** Esses dados sugerem que o polimorfismo genético IL-1 $\beta$  deve influenciar na manutenção da massa óssea em idosos.

**Descritores:** Idoso; Interleucina-1; Osteoporose; Polimorfismo genético.

### Abstract

**Introduction:** Genetics factors contribute to the risk of osteoporosis in the elderly. **Objective:** This study aimed to evaluate the relationship between polymorphisms in the genes: interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ) and vitamin D receptor (VDR) in 41 elderly patients with and without osteoporosis from basic health units. **Methods:** We extracted DNA from peripheral blood leukocytes of the elderly. Genetic polymorphisms were assessed by PCR-RFLP. The  $\chi^2$  test and Fisher exact test were used to evaluate the effect of each polymorphism on osteoporosis, with a significance level of 5%. **Results:** It has been found a significant association between the presence of osteoporosis and the gene polymorphism of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) in elderly women. With respect to the VDR gene was not detected significant association. **Conclusions:** These data suggest that IL-1 $\beta$  polymorphism may influence in the manutention of bone mineral density in elderly women.

**Key words:** Elderly; Genetic polymorphism; Interleukin-1; Osteoporosis.

## Introdução

Diversas modificações ocorrem com o envelhecimento, nos vários sistemas do organismo, em que se verifica um incremento no peso com aumento da porcentagem de gordura, diminuição da força, da massa muscular, da massa óssea, da eficiência cardiocirculatória, da coordenação motora e da agilidade. Entre essas várias transformações biológicas que acometem o indivíduo ao envelhecer, a osteoporose, sem dúvida, é a que mais se destaca, pois está relacionada à locomoção e à independência em suas atividades motoras<sup>1</sup>.

Dados estatísticos revelam que, no Brasil, a população propensa a desenvolver a osteoporose aumentou de 7,5 milhões, em 1980, para 15 milhões, no ano de 2000, acometendo 35 a 52% das mulheres com mais de 50 anos<sup>2</sup>.

A osteoporose constitui um grave problema de saúde pública<sup>3</sup>, apresenta um alto índice de morbidade e um elevado custo social<sup>4</sup>. Um estudo realizado no Brasil por Kowalski, Sjenzfeld e Ferraz<sup>4</sup>, relata que os custos pagos com o tratamento de osteoporose pelas pacientes representaram 11% da renda familiar mensal média.

A osteoporose é uma doença caracterizada pela redução da massa óssea e desarranjo da microarquitetura tecidual, propiciando fragilidade esquelética e consequentemente aumentando o risco de fraturas<sup>5</sup>. Cada vez mais, essa patologia é reconhecida como enfermidade limitante da qualidade de vida<sup>6</sup>, ocasionando muitas vezes incapacidade funcional, reduzindo o desempenho psicossocial e qualidade de vida, além de causar dores crônicas<sup>7</sup>.

Atualmente, a genética tem sido considerada determinante das variações nos fenótipos ósseos, com alguns autores estimando que a contribuição genética seja responsável por até 85% da variabilidade da Densidade Mineral Óssea (DMO) da coluna lombar e do quadril<sup>8-11</sup>. Com base nesses dados, diversos estudos têm sido desenvolvidos para analisar os aspectos genéticos relacionados às variações na DMO.

Desde o estudo inicial de Morrison et al.<sup>12</sup>, relacionando diretamente determinadas variações polimórficas no gene receptor de vitamina D, *Vitamin D Receptor* (VDR), com fenótipos ósseos, grande atenção foi dada à relação entre os diferentes alelos e a DMO. No entanto, a relação entre variações no gene VDR e a DMO ainda precisa ser esclarecida de forma mais consistente.

Outros estudos identificaram polimorfismos genéticos associados à DMO, perda óssea ou fraturas osteoporóticas<sup>13-16</sup>. Vale ressaltar que, polimorfismo de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou SNP), é definido pela existência da variação de uma única base entre indivíduos, num ponto particular do genoma, desde que a frequência da variante menos repetida seja de 1%, ou superior. Encontram-se já descritos cerca de 7 milhões de SNPs, em diferentes bases de dados públicas e privadas, a grande maioria dos quais já validados; ou seja, confirmados como polimórficos num ou mais grupos populacionais<sup>17</sup>.

Em um estudo colaborativo de metanálise envolvendo 150 genes relacionados à osteoporose e às fraturas osteoporóticas, Richards et al.<sup>18</sup> avaliaram o efeito dos SNPs em genes candidatos descritos na literatura para a DMO. Os autores descobriram que a maioria dos SNPs em genes previamente identificados como relacionados à osteoporose não foram associados com a doença. Entretanto, confirmaram que as variações em nove genes (ESR1, LRP4, ITGA1, LRP5, SOST, SPP1, TNFRSF11A, TNFRSF11B e TNFRSF11) influenciam a DMO, e que variações em quatro desses genes (SPP1, SOST, LRP5 e TNFRSF11A) também estão relacionadas ao risco de fratura.

A hipótese de que genes candidatos desempenham um papel na osteoporose incluem a avaliação daqueles envolvidos na formação e remodelamento ósseo (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias tal como IL-1B), os envolvidos na sinalização hormonal (por exemplo, ESR1 e VDR), e aqueles que codificam proteínas da estrutura óssea (como, COL1A1).

Diante do exposto, o objetivo neste estudo foi verificar a relação entre polimorfismo nos genes da IL1- $\beta$  e do VDR com a osteoporose em idosos do município de Londrina-PR.

## Materiais e métodos

Foram incluídos no trabalho 41 indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos, de ambos os gêneros, provenientes de unidades básicas de saúde de Londrina-PR, e que aceitaram participar voluntariamente do estudo. Foram excluídos da amostra os sujeitos que apresentavam alguma doença ou limitação que impedia a realização dos testes, como deficiências físicas e mentais.

Todos os participantes, após terem sido informados sobre a proposta do estudo e os procedimentos aos quais seriam submetidos, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido com o objetivo de respeitar a Resolução 196/96. Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná certificado pelo Conselho Nacional de Saúde (PP/0100/10).

O DNA foi obtido de leucócitos do sangue periférico, utilizando o *kit* de extração de DNA, seguindo orientações do fabricante (PureLink Genomic DNA Kits – Invitrogen, Brasil). Os DNAs extraídos foram acondicionados em freezer -80° C para posterior análise dos polimorfismos.

Para a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) do gene da IL1- $\beta$  foram utilizados os seguintes iniciadores: 5'– CTC AGG TGT TCC TCG AAG AAA TCA A – 3', *Reverse* 5'– GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG – 3' e para a amplificação do gene VDR foram utilizados os iniciadores: 5' – CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G – 3' e 5'– GGA TGT ACG TCT GCA GTG TG – 3'.

A mistura da PCR para os dois genes consistiu em um volume total de 50  $\mu$ l, contendo 100 ng de DNA genômico, 1,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada *primer*, 200  $\mu$ M de dNTPs e 2 U de Taq DNA

polimerase. As soluções foram incubadas em um termociclador TC-512 Techne™ (New Jersey, USA). As condições de amplificação foram de um ciclo a 95 °C por dois minutos de desnaturação inicial, 38 ciclos de amplificação, consistindo em cada ciclo por um minuto a 95 °C, um minuto a 67°C e um minuto a 74°C , e extensão final a 72 °C por oito minutos. O fragmento amplificado para o gene IL-1 $\beta$  foi 182pb, e para o VDR, de 340pb.

Após a amplificação, 5  $\mu$ l do produto da PCR foi analisado pela eletroforese em gel de agarose (1,0%). Posteriormente, o gel foi corado por *Sybr Safe* (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brasil) e os fragmentos recém-sintetizados foram visualizados sob luz ultravioleta e a leitura e análise do gel foi realizada com o programa LABImage L-PIX (H.E.) 1D-L340 (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho do produto amplificado pela PCR foi estimado a partir da migração eletroforética do produto relativo ao marcador de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brasil).

Para a técnica de RFLP, 12  $\mu$ l do produto amplificado pela PCR foram adicionados ao Tampão NE 1x, 0,2  $\mu$ l de TaqI (10.000 U/ml) e 10,3  $\mu$ l de água deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 37 °C *overnight*. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados por nitrato de prata. Os produtos resultantes da digestão do gene da IL-1 $\beta$  foram dois fragmentos de 85 pb + 97 pb denominados de alelo 1 e um fragmento não digerido de 182 pb denominado de alelo 2. Para o gene VDR os alelos foram designados “t” (presença do sítio para *TaqI*, formando um fragmento de 260 pb e outro com 80pb) e “T” (ausência de sítio para *TaqI*, mantendo o fragmento de 340 pb).

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS v.11.5 (SPSS Inc.). O teste de  $\chi^2$  e o teste exato de Fischer foram usados para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o efeito de cada polimorfismo na osteoporose. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados

Participaram do estudo 41 idosos, sendo a maioria representada pelo gênero feminino (53,7%), pertencente à etnia branca (68,3%), com faixa etária entre 60 e 75 anos (75,6%) e 4 (9,8%) eram portadores da doença osteoporose (Tabela 1).

**Tabela 1:** Características demográficas e presença de osteoporose em idosos do município de Londrina-PR (n = 41)

Características	(n)	(%)
<b>Gênero</b>		
Feminino	22	53,7
Masculino	19	46,3
<b>Etnia</b>		
Branca	28	68,3
Negra	12	29,3
Parda	1	2,4
Amarela	0	0,0
<b>Idade</b>		
60 - 75	31	75,6
> 75	10	24,4
<b>Osteoporose</b>		
Com	4	9,8
Sem	37	90,2

Em relação ao genótipo desses idosos, a maioria é representada por heterozigotos, tanto para o gene IL-1 $\beta$  quanto para o gene VDR (Tabela 2).

Ao analisar a relação entre os genótipos e a osteoporose, pode ser verificado para o polimorfismo no gene IL-1 $\beta$  uma associação estatisticamente significativa ( $p = 0,032$ ). Os idosos que eram homozigotos para o alelo 2 (66,7%) mostraram uma correlação positiva com a doença osteoporose ( $r=0,34$ ;  $p < 0,05$ ), enquanto aqueles que eram heterozigotos ou homozigotos para o alelo 1 não apresentaram a doença. Para o polimorfismo no gene VDR não foi encontrada uma associação significativa com a presença de osteoporose na amostra estudada (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra uma associação estatisticamente significativa ( $p = 0,007$ ) entre a os-

**Tabela 2:** Distribuição genotípica para IL1- $\beta$  e VDR na população de idosos

Genótipos	n (%)	Alelo	Frequência alélica	Valor de p HWE
<b>IL1-<math>\beta</math></b>				
1/1	9 (22,0)	1	0,60	
1/2	31 (75,6)	2	0,40	
2/2	1 (2,4)			
Total	41			13,47
<b>VDR</b>				
TT	4 (9,9)	T	0,46	
Tt	30 (73,1)	t	0,54	
Tt	7 (17)			
Total	41			9,11

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 3:** Associação entre os genótipos dos idosos para os genes IL1- $\beta$  e VDR e a osteoporose

Genótipos	Osteoporose			
	Com N	(%)	Sem N	(%)
<b>IL1-<math>\beta</math><sup>a</sup></b>				
Homozigoto alelo 1	0	0	9	100
Homozigoto alelo 2	2	66,7	1	33,3
Heterozigoto	2	6,9	27	93,1
<b>VDR*</b>				
Homozigoto alelo 1	0	0	4	100
Homozigoto alelo 2	0	0	4	100
Heterozigoto	4	(12.1)	29	(87.9)

<sup>a</sup> $\chi^2 = 12,27$ ;  $p = 0,032$

\* $\chi^2 = 1,07$ ;  $p = 0,337$

teoporose e o genótipo somente para o gênero feminino. Pode ser verificado que 66,7% das mulheres com osteoporose são homozigotas para o alelo 2, em contrapartida, as que são heterozigotas ou homozigotas para o alelo 1 não apresentam essa comorbidade.

## Discussão

O sistema imune apresenta uma função relevante no remodelamento ósseo por meio das

**Tabela 4:** Associação entre os genótipos de IL-1 $\beta$  e  $\alpha$  osteoporose em idosos segundo o gênero

Gênero	Genótipos	Osteoporose			
		Com N	(%)	Sem N	(%)
Masculino <sup>a</sup>	1/1	0	66,7	1	5,6
	2/2	0	0	5	27,8
	1/2	1	100	12	66,7
Feminino*	1/1	0	0	4	21,1
	2/2	2	66,7	0	0
	1/2	1	33,3	15	78,9
<sup>a</sup> $\chi^2 = 0,487$ ; p = 0,676 * $\chi^2 = 14,039$ ; p = 0,07					

citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, a senilidade é de fato notável para a aceleração de enfermidades que estão cada vez mais atribuídas a uma inflamação, tais como aterosclerose, doença de Alzheimer, asma e osteoporose<sup>19-22</sup>. Várias citocinas, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, são elevadas durante a senescência e desempenham um papel direto na patogênese dessas doenças<sup>20</sup>. A osteoporose é uma doença poligênica, sendo afetada pela expressão de muitos genes na regulação da formação óssea e fraturas osteoporóticas; por exemplo, hormônios e receptores, tais como o receptor de vitamina D (VDR) e receptor de estrógeno (*estrogen receptor* – ER); citocinas e seus receptores, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra e fator transformador de crescimento  $\beta$ <sup>23, 24</sup>. Entre os fatores genéticos na patogênese da osteoporose, o sistema IL-1 foi demonstrado ser a citocina mais importante na modulação do crescimento de células de reabsorção óssea em mulheres pós-menopausa<sup>25</sup>. O sistema IL-1 é composto por IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra. Ambas as IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ligam-se ao receptor de IL-1 na superfície das células sanguíneas, e iniciam uma cascata de sinal de transdução para estimular uma potente resposta pró-inflamatória que inicia a reabsorção óssea.

Neste estudo, resultados da frequência alélica e genotípica mostraram que os genótipos da IL- $\beta$  se apresentaram mais em mulheres com osteoporose. Esses resultados são consistentes com outros estudos prévios. Chen et al.<sup>22</sup> relata-

ram que polimorfismos nos genes IL-1 $\beta$  e IL-1ra foram associados a BMD e osteoporose em mulheres pós-menopausa. A associação entre polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$  com osteoporose foi evidenciado também por Chao et al.<sup>26</sup>.

O polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$  tem sido associado com um aumento na sua produção. Indivíduos homozigotos para o alelo 2 produzem 4% mais dessa citocina comparado aos que apresentam o genótipo 1/1<sup>27</sup>. Portanto, quando produzida em quantidade excessiva, ela pode induzir mecanismos que culminam na reabsorção óssea, inibição da síntese do colágeno e ativação das metaloproteinases, causando destruição de tecido conjuntivo e osso alveolar<sup>28</sup>. Assim, o alelo 1 tem um efeito protetor contra a osteoporose.

Somente um participante foi homozigoto para o alelo 1 era do gênero masculino e não apresentava a doença osteoporose. Os homens, segundo Yasbek e Neto<sup>29</sup>, são acometidos pela osteoporose por outros mecanismos, ligados essencialmente ao envelhecimento. Neles, a diminuição progressiva do calcitriol e da absorção intestinal de cálcio levam a um aumento do paratormônio (PTH), o que justifica a instalação da osteoporose nessa população.

O receptor da vitamina D (VDR) atua como mediador na ação da vitamina D do sistema endócrino na homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo. Nesta pesquisa, não foi encontrada associação entre o polimorfismo no gene VDR e a presença de osteoporose na amostra estudada. Apesar de não confirmar os dados iniciais de Morrison et al.<sup>12</sup>, os resultados estão de acordo com relatos em literatura<sup>15, 30</sup>. Embora a heterogeneidade alélica (por exemplo, diferentes mutações dentro de um gene podem ter efeitos distintos sobre o risco de fraturas) seja talvez uma possível explicação para a discrepância nos resultados, outras questões como o tamanho da amostra, análise dos dados, características da população, bem como a interação entre genes e fatores ambientais poderiam ter também contribuído para essa situação. Esses fatos, tomados em conjunto, sugerem que genótipos no gene



VDR e sua relação com osteoporose podem variar entre as populações.

## Conclusão

O polimorfismo genético encontrado no gene da interleucina 1- $\beta$  pode ser um fator genético que deve influenciar na manutenção da massa óssea em idosos. A relação entre o polimorfismo no gene VDR e a osteoporose em idosos ainda não está claro. Portanto, é essencial a realização de estudos para confirmar estes resultados em populações maiores e outros grupos étnicos, assim como análise de outros polimorfismos e fatores ambientais.

## Referências

- Meirelles ES. Osteoporose. *Rev Bras Med*. 1994;50:135-49.
- Carvalho CMRG, Fonseca CCC, Pedrosa JI. Educação para a saúde em osteoporose com idosos de um programa universitário: repercussões. *Cad Saúde Pública*. 2004;20(3):719-26.
- Pinheiro MM, Ciconelli RM, Jacques NO, Genaro PS, Martini LAM, Ferraz MB. The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(2):113-27.
- Kowalski SC, Sjenzfeld VL e Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Rev Ass Med Brasil*. 2001;47(4):352-7.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention Diagnosis and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-95.
- Lemos MCD, Miyamoto ST, Valim V, Natour J. Qualidade de Vida em Pacientes com Osteoporose Correlação entre OPAQ e SF-36. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(5):323-8.
- Culham EG, Jimenez HA, King CE. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. *Spine*. 1994;19(11):1250-5.
- Dequecker J, Nijs J, Verstraeten A, Geusens P, Gevers G. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: a twin study. *Bone*. 1987;8(4):207-9.
- Sowers MR, Boehnke M, Jannausch ML, Crutchfield M, Corton G, Burns TL. Familiality and partitioning the variability of femoral bone mineral density in women of child-bearing age. *Calcified Tissue Int*. 1992;50(2):110-4.
- Livshits G, Karasik D, Otremski I, Kobyliansky E. Genes play an important role in bone aging. *Am J Hum Biol*. 1998;10(4):421-4.
- Van Den Oord EJCG, Macgregor AJ, Snieder H, Spector TD. Modeling with measured genotypes: effects of vitamin D receptor gene, age, and latent genetic and environmental factors on bone mineral density. *Behavior Genetics*. 2004;34(2):197-206.
- Morrison NA, Tokita A, Kely PL, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367(6460):284-7.
- Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcels S, Brandi ML, et al. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Boné*. 2008;42:969-81.
- Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcels S, Langdahl BL, Lips P. et al. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med*. 2006;3:90.
- Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2006;145:255-64.
- Van Meurs Jb, Trikalinos Ta, Ralston Sh, Balcels S. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *Jama*. 2008;299:1277-90. Van Meurs Jb, Trikalinos Ta, Ralston Sh, Balcels S, et al. Large-Scale Analysis Of Association Between LRP5 And LRP6 Variants And Osteoporosis. *JAMA* 2008;299:1277-90
- Mamotte CD. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin Biochem Rev*. 2006;27:63-75.

18. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV et al. Genetic factors for osteoporosis consortium. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med.* 2009;151(8):528-37.
19. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244-54.
20. Bruunsgaard H, Pedersen BK: Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003;23:15-39.
21. Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C: Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence. *Trends Immunol.* 2005;26:79-84.
22. Chen HY, Chen WC, Wu MC, Tsai FJ, Lin CC. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Maturitas.* 2002;44:49-54.
23. Samelson EJ, Cupples LA, Hannan MT, Wilson PW, Williams SA, Vaccarino V, Zhang Y, Kiel DP. Long-term effects of serum cholesterol on bone mineral density in women and men: the Framingham Osteoporosis Study. *Bone.* 2004;34(3):557-61.
24. Albagha OM, Pettersson U, Stewart A, McGuigan FE, MacDonald HM, Reid DM, Ralston SH. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet.* 2005;42(3):240-6.
25. Zarrabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Napal J, Gonzalez-Macias J. Cytokine production by peripheral blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner.* 1991;14(2):161-7.
26. Chao TH, Yu HN, Huang CC, Liu WS, Tsai YW, Wu WT. Association of interleukin-1 beta (-511C/T) polymorphisms with osteoporosis in postmenopausal women. *Ann Saudi Med.* 2010;30(6):437-41.
27. Pociot F, Mølvig J, Wogensén L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992;22(6):396-402.
28. Al-Qawasmi RA, Hartsfield Junior JK, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM. et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123:242-52.
29. Yasbek MA, Marques Neto JF. Osteoporose e outras doenças osteometabólicas no idoso. *Einstein.* 2008;6(1):74-8.
30. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Boonen S. Polymorphisms of the VDR, ER and COLIA1 genes and osteoporotic hip fracture in elderly postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2000;11:583-91.