

Caracterização de polimorfismos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em uma população brasileira

Characterization of OPG, RANK and RANKL gene polymorphisms in a Brazilian population

Francine Vilma de Oliveira¹, Camila Alexandrina Figueiredo², Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto^{3*}

¹Mestranda do Programa do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, UFBA;

²Professora Associada, Instituto de Ciências da Saúde, Programa do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas –UFBA; ³Professora Adjunta, Instituto de Ciências da Saúde, Programa do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – UFBA.

Resumo

Introdução: o sistema *RANKL* (receptor-ativador do fator nuclear-ligante κB)/*RANK* (receptor ativador do NF-κB)/*OPG* (osteoprotegrina) regula os processos fisiológicos e patológicos da remodelação óssea. Polimorfismos genéticos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* têm sido associados a doenças, em diferentes populações. **Objetivo:** Descrever a frequência e o potencial regulatório dos polimorfismos do sistema *OPG*, *RANK* e *RANKL* em uma população brasileira; avaliar o seu potencial como marcadores genéticos informativos de ancestralidade; comparar com patologias associadas em outras populações. **Metodologia:** neste estudo, 506 indivíduos adultos, participantes de uma coorte acometidos de asma e periodontite, tiveram o DNA genômico extraído e genotipado, utilizando-se a plataforma Illumina. As plataformas NCBI, RegulomeDB, Haploview 4.2 e rSNPBase foram consultadas e utilizadas para análises. **Resultados e Discussão:** os polimorfismos mais frequentes na população estudada foram o rs3102724 no gene *OPG*, com frequência de menor alelo (MAF) de 46%; o rs4941129 em *RANK*, MAF 50%; e o rs9525641 em *RANKL*, MAF 46%. Os rs3134063 (1f) em *OPG*, rs17069898 (1f) em *RANK* e rs2200287 (1d) em *RANKL* apresentaram maior impacto funcional. Em *OPG* e *RANK*, nove polimorfismos se caracterizaram como marcadores genéticos informativos de ancestralidade, com predomínio nas populações YRI (africanos) e CEU (europeus). Os nove polimorfismos, com função intrônica, apresentaram MAF entre 2 a 46% na população-alvo e foram associados a patologias do metabolismo ósseo em outras populações. **Conclusão:** polimorfismos dos genes estudados se mostraram frequentes na população estudada e tiveram seus alelos mais frequentes associados a doenças em populações ancestrais. Sugere-se que sejam realizados mais estudos.

Palavras-chave: Polimorfismo de Nucleotídeo Único. *OPG*. *RANK*. *RANKL*. Ancestralidade.

Abstract

Introduction: The *OPG* (osteoprotegerin)/ *RANK* (NF-κB activating receptor)/ *RANKL* (nuclear-binding factor κB receptor-activating system) regulates the physiological and pathological processes of bone remodeling. Genetic polymorphisms (SNPs) in *OPG*, *RANK* and *RANKL* genes have been associated with diseases in different populations. **Objective:** Describe the regulatory frequency and potential of SNPs in *OPG*, *RANK* and *RANKL* in a Brazilian population; assess their potential as informative genetic markers of ancestry; compare with pathologies associated with these polymorphisms in other populations. **Methods:** in this study, 506 adult individuals, participating in a cohort involving asthma and periodontitis, had genomic DNA extracted and genotyped using the Illumina platform. The NCBI, RegulomeDB, Haploview 4.2 and rSNPBase platforms were consulted and used for analysis. **Results and discussion:** the most frequent polymorphisms in the studied population were the rs3102724 in the *OPG* gene, with the lowest allele frequency (MAF) of 46%; rs4941129 in *RANK*, MAF 50% and rs9525641 in *RANKL*, MAF 46%. The rs3134063 (1f) in *OPG*, rs17069898 (1f) in *RANK* and rs2200287 (1d) in *RANKL*, had greater functional impact. In *OPG* and *RANK*, 9 SNPs were characterized as informative genetic markers of ancestry, predominantly in YRI (African) and CEU (European) populations. These 9 SNPs, with intronic function, presented MAF between 2 and 46% in our population, and were associated with pathologies in bone metabolism in other populations. **Conclusion:** SNPs of the studied genes were found to be frequent in the studied population and had their most frequent alleles associated with diseases in ancestral populations. It is suggested that further studies be carried out.

Keywords: Single Nucleotide Polymorphism. *OPG*. *RANK*. *RANKL*. Ancestry.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é metabolicamente ativo e o sistema *OPG* (osteoprotegrina) / *RANK* (receptor ativador do NF-κB) / *RANKL* (receptor-ativador do fator nuclear-ligante κB) regulam a reabsorção e a deposição óssea que ocorrem no processo de remodelação óssea. Esse sistema está envolvido no metabolismo ósseo e no sistema imunológico.

Correspondente/Corresponding: *Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia - End: Av. Reitor Miguel Calmon S/N, Vale do Canela, Salvador-BA CEP: 40110-100 - Tel/Fax: +55 (71) 3283-8900 - E – mail: tati-oliveira@hotmail.com

co em processos fisiológicos e patológicos (BOYLE *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2020). O *RANKL* está expresso em vários tipos de células, como fibroblastos, linfócitos B, linfócitos T (COCHRAN *et al.*, 2008), odontoblastos, ameloblastos (SILVA *et al.*, 2008), osteoblastos e osteócitos. Sendo assim, ele tem sido adotado para o tratamento da osteoporose, artrite reumatoide e tumores, como o câncer de mama (ONO *et al.*, 2020). O *RANKL* liga-se ao seu receptor *RANK* em macrófagos, precursores dos osteoclastos, resultando na diferenciação destes em osteoclastos diferenciados e ativos que secretam enzimas responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea. A transformação de proteínas morfogênicas ósseas relacionadas ao fator de crescimento β é o que regula os níveis de *OPG*. Altas concentrações de *OPG* evitam a perda óssea, já que a ligação *RANK-RANKL* é impedida, pois *OPG* é um receptor solúvel de *RANKL*. Entretanto, na doença periodontal, por exemplo, um aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido periodontal, como IL-1 β e TNF, aumentam a quantidade de *RANKL* em relação à *OPG*, levando à perda óssea (DARVEAU *et al.*, 2010). *RANKL*, *RANK* e *OPG* pertencem à superfamília de citocinas TNF (NAKASHIMA; HAYASHI; TAKAYANAGI, 2012; OKAMOTO *et al.* 2017).

O gene *RANKL* humano (símbolo do gene: *TNFSF11*) está localizado no cromossomo 13 (13q14.11) e codifica uma glicoproteína com 317 aminoácidos. O gene *RANK* humano (símbolo do gene: *TNFRSF11A*) está localizado no cromossomo 18 (18q21.33) e codifica um receptor com 616 aminoácidos. O gene *OPG* humano (símbolo do gene: *TNFRSF11B*) está localizado no cromossomo 8 (8q24.12) e codifica um receptor com 401 aminoácidos (ONO *et al.*, 2020). Como a via de sinalização *RANK/RANKL* está ligada diretamente à formação e à função dos osteoclastos, mutações genéticas que resultem no aumento dessas células aumentarão a reabsorção óssea. Se o gene que codifica *OPG*, que é o receptor charme de *RANK*, sofrer exclusão ou mutações podem ocorrer alterações nos sinais de *RANK*, sem alterar os níveis de *RANKL*. Já duplicações no primeiro éxon do *RANK*, que resultem na presença de mais 5, 6 ou 9 aminoácidos no peptídeo sinal, podem levar à retenção do receptor não processado na célula, ao invés da sua inserção na membrana plasmática. Vários mecanismos acabam ativando automaticamente esse receptor interno, produzindo sinais que levam à geração de maior número de osteoclastos ativos (TEITELBAUM; ROSS, 2003).

A expressão de *OPG*, *RANK* e *RANKL* em diversas células já foi amplamente descrita na literatura. Polimorfismos genéticos nesses genes podem estar relacionados com diversas patologias, como a periodontite, a osteoporose e a artrite reumatoide. A variação da sequência de nucleotídeos em um alelo de um gene é conhecida como polimorfismo, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) os tipos mais frequentes de alterações genéticas entre os indivíduos. A função de uma proteína pode ser alterada por um SNP, resultando numa susceptibilidade

para o desenvolvimento do fenótipo para determinada doença (KÖBERLE *et al.*, 2016). Polimorfismos genéticos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* têm sido descritos para diversas doenças, já citadas anteriormente, em diferentes populações. Ao considerarmos que a população brasileira apresenta grande miscigenação racial, sendo descendente de três grupos raciais principais – : africanos, europeus e ameríndios (LIMA-COSTA *et al.*, 2015) – torna-se relevante a descrição de polimorfismos genéticos dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em uma população de Salvador (BA), em comparação com suas populações ancestrais (europeia e africana), bem como a avaliação de quais condições já foram descritas anteriormente, associadas a tais polimorfismos, em outras populações.

METODOLOGIA

População do Estudo

Estudaram-se 506 indivíduos participantes de uma coorte, envolvendo asma e periodontite, cujo DNA genômico foi extraído e genotipado utilizando-se a plataforma Illumina. Incluíram-se no estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade ≥ 18 anos, moradores de Salvador, Bahia, Brasil. Os parentes consanguíneos foram excluídos.

Esta pesquisa segue os requisitos éticos e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Comitê da Maternidade Clímério de Oliveira (sob número de protocolo: 095/2012), coordenado pelo prof. Álvaro Cruz, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

Extração do DNA Genômico e Genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico dos indivíduos, de acordo com o protocolo do kit Gentra® Puregene® Blood Kit (Quiagen). As amostras foram genotipadas pela Illumina, grande plataforma de varredura com 2,5 milhões de marcadores genotipados em todo o genoma. Neste estudo, as informações genéticas foram extraídas de 59992543 a 60058521, posições localizadas no cromossomo 18 (*RANK*); de 43136872 a 43182149 posições localizadas no cromossomo 13 (*RANKL*); e de 119935796 a 119964124, posições localizadas no cromossomo 8 (*OPG*), versão do genoma: GRCh37. Considerando a mistura genética da população brasileira, usaram-se dados disponíveis no International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>), através do algoritmo de Tagger, usando o programa HaploView (<http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/>; <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) nas seguintes populações: indivíduos residentes de Utah nos Estados Unidos, com ancestralidade europeia setentrional e ocidental (CEU), indivíduos iorubás de Ibadan, Nigéria (YRI), e indivíduos da etnia *han* de Pequim, China (CHB). Após a realização dos ensaios, foram considerados para análise SNP com taxa de genotipagem inferior a 0,98 e desequilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de $p < 0.05$.

Análises *in silico*

As análises funcionais *in silico* foram realizadas para cada SNP, deste estudo, presente nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL*. Todos os polimorfismos genéticos usados neste estudo estão catalogados em bancos de dados públicos, como o repositório de polimorfismos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) e a função de cada variação genética foi obtida no mesmo banco. O Desequilíbrio de Ligação (DL), que traz a associação de alelos no mesmo cromossomo, mas em *loci* diferentes, foi calculado pelo *software* Haploview 4.2, onde também foi calculado o grau de confiança no valor r^2 (BARRET *et al.*, 2005). O valor de $r^2 \geq 0,8$ foi considerado como alta correlação entre os SNP (MU; ZHANG, 2013). Para a interpretação de polimorfismos regulatórios no genoma humano, utilizou-se o banco de dados RegulomeDB (www.regulomedb.org), que inclui alto rendimento, conjuntos de dados experimentais de ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) e outras fontes. De acordo com as análises, os SNP foram avaliados para afetar a expressão gênica, a função da proteína e como ligação do fator de transcrição (FRIEDRICHS *et al.*, 2016). No RegulomeDB, uma pontuação de 1 a 7 relaciona a probabilidade do impacto do SNP na expressão do gene, onde pontuações de 1 a 3 podem afetar a ligação; de 4 a 6 têm menos evidências vinculativas; e não há informação disponível sobre a pontuação 7. O rSNPBase 3.0, um banco de dados regulatório dos SNP, além de fornecer anotações regulatórias intuitivas do SNP que podem ser usadas como orientação concreta para estudos de acompanhamento – o rSNP-Base 3.0 – também permite uma visão mais sistemática dos potenciais mecanismos regulatórios relacionados aos seus SNP (GUO; WANG, 2018).

Marcadores de ancestralidade

As principais populações do Brasil são de origem europeia, africana e ameríndia. Assim, as populações utilizadas como pseudoancestrais foram as de origem do norte e oeste da Europa (CEU), indivíduos iorubás de Ibadan, Nigéria (YRI) e indivíduos *han* de Pequim, China (CHB). A população CHB demonstra ter frequências de alelo semelhantes aos nativos americanos (SILVA *et al.*, 2015). Para verificar essa diferença entre as populações que deram origem à população brasileira, utilizaram-se os AIM (do inglês Ancestry Informative Markers). Esses marcadores genéticos informativos de ancestralidade mostram grandes variações de diferencial de frequências alélicas ($\delta \geq 0,3$) entre duas populações de origens geográficas distintas (SHRIVER *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2015). Utilizou-se o IGSR (International Genome Sample Resource) (www.internationalgenome.org), plataforma de dados construída com base no Projeto 1000 Genomas, maior catálogo abertamente acessível de variação genômica humana, desenvolvido a partir de amostras que abrangem cinco continentes, para verificar a frequência

de alelos nas populações ancestrais, através do navegador de genomas *Ensembl*, utilizando como referência o genoma GRCh37p.13 (FAIRLEY *et al.*, 2020).

RESULTADOS

Os polimorfismos genéticos mais frequentes no gene *OPG* na população estudada foram rs3102724, rs3134063, rs1032128, rs10505346 e rs4876869, com a frequência do menor alelo (MAF), variando entre 46% e 25%. Todos dispõem da função intrônica, sendo que o rs10505346 também se caracteriza como *upstream intron*. Em relação ao impacto funcional, o rs3134063 se destacou com *score* 1f no banco de dados RegulomeDB, o que significa que provavelmente pode afetar a ligação e a expressão de um alvo genético. Já os polimorfismos menos frequentes em *OPG* nessa população foram o rs74418767 e o rs10955913 com MAF de 2% (Tabela 1). Dos 5 polimorfismos mais frequentes na população estudada, somente o rs10505346 não se caracterizou como AIM (Tabela 4).

Em relação ao gene *RANK*, os polimorfismos que tiveram a maior frequência do alelo polimórfico na população do estudo foram rs4941129, rs4369774, rs17069898, rs7239261, rs1805034, rs6567272, com este MAF variando entre 50% e 36%. Os SNP rs4941129, rs4369774, rs7239261 têm função intrônica e de transcrição gênica. O rs17069898 e o rs6567272 têm função intrônica e o rs1805034 é missense podendo ter impacto na sequência de codificação. O rs35184120, também é missense, porém apresentou frequência de 1% na população em questão, ficando entre as menos frequentes, juntamente com rs9949037 e o rs60915364, ambos com MAF de 1%. Sobre o ranking do Regulome-Db, destaca-se a pontuação 1f do rs17069898, o que indica que possivelmente esse SNP está envolvido em funções reguladoras ou funcionais do gene *RANK* (Tabela 2). Dos polimorfismos mais frequentes na população aqui estudada nenhum se apresentou como marcador informativo de ancestralidade quanto às populações pseudoancestrais (Tabela 4).

Para o gene *RANKL*, os polimorfismos que se mostraram mais frequentes na população estudada foram rs9525641, rs3742257, rs9533156, rs2200287, rs73174434, com frequência de menor alelo variando entre 46% e 27%. Os SNP rs3742257, rs2200287, rs73174434 apresentam função intrônica; e os rs9525641 e rs9533156, além dessa função, caracterizam-se como *upstream transcript variant*. O SNP rs138974661 é missense e teve a frequência de menor alelo (1%) baixa nessa população, bem como o rs866665000, também com MAF de 1%. O rs2200287 destacou-se entre esses polimorfismos por apresentar impacto funcional 1d no RegulomeDb (Tabela 3). Nenhum dos polimorfismos no *RANKL* se mostrou como AIM (Tabela 4).

Tabela 1 – Descrição dos polimorfismos em OPG na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDb.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	FUNÇÃO	HWE	REGULOMEDB (SCORE)
8	OPG	rs3102724	A	G	0.46	intron	0.65	7
8	OPG	rs3134063	G	A	0.31	intron	0.48	1f
8	OPG	rs1032128	A	G	0.29	intron	0.73	7
8	OPG	rs10505346	A	C	0.27	2KB_upstream_variant, intron_variant, upstream_transcript_variant	0.84	4
8	OPG	rs4876869	G	A	0.25	intron	0.84	4
8	OPG	rs7815884	A	G	0.19	3_prime_UTR_variant	0.26	5
8	OPG	rs10955911	A	G	0.17	intron	0.21	6
8	OPG	rs3134064	A	T	0.10	intron	0.48	6
8	OPG	rs11573938	A	G	0.09	intron	1	6
8	OPG	rs11573897	A	G	0.05	intron	1	5
8	OPG	rs11573898	A	G	0.04	intron	1	5
8	OPG	rs11573863	T	A	0.04	intron	1	5
8	OPG	rs11573902	C	A	0.04	intron	1	7
8	OPG	rs11573875	A	G	0.03	intron	1	6
8	OPG	rs74418767	A	G	0.02	intron	1	6
8	OPG	rs10955913	A	G	0.02	intron	1	4

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Tabela 2 – Descrição dos polimorfismos em RANK na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDb.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	FUNÇÃO	HWE	REGULOMEDB (SCORE)
18	RANK	rs4941129	A	G	0.5	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.76	4
18	RANK	rs4369774	A	C	0.47	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.76	4
18	RANK	rs17069898	A	G	0.41	intron	0.27	1f
18	RANK	rs7239261	A	C	0.38	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.28	4
18	RANK	rs1805034	G	A	0.36	coding_sequence_variant, missense_variant	0.64	5
18	RANK	rs6567272	G	A	0.36	intron	0.76	5
18	RANK	rs8087597	G	A	0.31	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.17	3a
18	RANK	rs4355028	A	G	0.31	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.17	2b
18	RANK	rs12970081	A	G	0.30	intron	0.26	4
18	RANK	rs8099222	A	G	0.29	intron	0.01	5
18	RANK	rs4941132	A	T	0.26	intron	0.22	5
18	RANK	rs4426449	A	G	0.25	intron	0.67	7
18	RANK	rs58112300	G	A	0.24	intron	0.84	5
18	RANK	rs9951012	A	G	0.23	intron	0.24	4
18	RANK	rs6567266	A	G	0.19	intron	0.46	4
18	RANK	rs4940552	C	A	0.19	3_prime_UTR_variant, genic_downstream_transcript_variant	0.33	2b
18	RANK	rs12165104	A	G	0.16		1	5
18	RANK	rs73963407	G	A	0.16	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	0.32	4
18	RANK	rs17720953	A	G	0.14	genic_upstream_transcript_variant, upstream_transcript_variant, intron_variant	0.49	4
18	RANK	rs4442919	C	G	0.14		0.53	3a
18	RANK	rs7236029	G	A	0.14	3_prime_UTR_variant, genic_downstream_transcript_variant	0.21	4
18	RANK	rs79882996	A	G	0.12	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant, upstream_transcript_variant	1	4
18	RANK	rs3826618	G	A	0.11	intron	0.42	6

Caracterização de polimorfismos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em uma população brasileira

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	FUNÇÃO	HWE	REGULOMEDB (SCORE)
18	RANK	rs78325991	G	A	0.11	intron	0.04	5
18	RANK	rs884205	A	C	0.11	3_prime_UTR_variant	0.22	2b
18	RANK	rs55889857	G	A	0.11	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.40	5
18	RANK	rs12458117	A	G	0.10	intron	0.63	5
18	RANK	rs12959053	A	G	0.09	intron	0.15	5
18	RANK	rs72931598	A	G	0.08	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.59	5
18	RANK	rs76629319	C	A	0.08	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.11	4
18	RANK	rs34739845	G	A	0.08	intron	0.22	2b
18	RANK	rs11873734	G	A	0.06	intron	1	6
18	RANK	rs116698469	G	A	0.05	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant,upstream_transcript_variant	1	3 ^a
18	RANK	rs56173102	A	G	0.05	intron	0.43	2b
18	RANK	rs12969154	A	G	0.05	intron	0.26	2b
18	RANK	rs75923485	A	G	0.04	intron	0.26	5
18	RANK	rs9956850	A	G	0.02	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	1	5
18	RANK	rs4500848	A	G	0.02	upstream_transcript, intron, genic_upstream_transcript	1	4
18	RANK	rs72933609	G	A	0.02	intron	1	5
18	RANK	rs9949037	A	C	0.01	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	1	3a
18	RANK	rs60915364	G	A	0.01	genic_upstream_transcript_variant, intron_variant	1	3a
18	RANK	rs35184120	A	G	0.01	coding_sequence_variant, intron_variant,missense_variant	1	4

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^acromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Tabela 3 – Descrição dos polimorfismos em *RANKL* na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDb.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	FUNÇÃO	HWE	REGULOMEDB (SCORE)
13	RANKL	rs9525641	G	A	0.46	upstream_transcript_variant, intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	0.76	4
13	RANKL	rs3742257	A	G	0.45	intron	0.45	5
13	RANKL	rs9533156	G	A	0.45	upstream_transcript_variant, intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	1	4
13	RANKL	rs2200287	A	G	0.38	intron	0.53	1d
13	RANKL	rs73174434	G	A	0.27	intron	0.52	6
13	RANKL	rs9533154	A	G	0.26	intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	0.51	5
13	RANKL	rs2277439	G	A	0.20	intron	1	5
13	RANKL	rs7334187	C	A	0.10	intron	0.70	5
13	RANKL	rs79843656	A	G	0.04	intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	1	4
13	RANKL	rs866665000	A	G	0.01	genic_upstream_transcript_variant, upstream_transcript_variant,intron_variant	1	5
13	RANKL	rs138974661	A	G	0.01	missense_variant,coding_sequence_variant	1	6

Fonte: Dados do estudo.

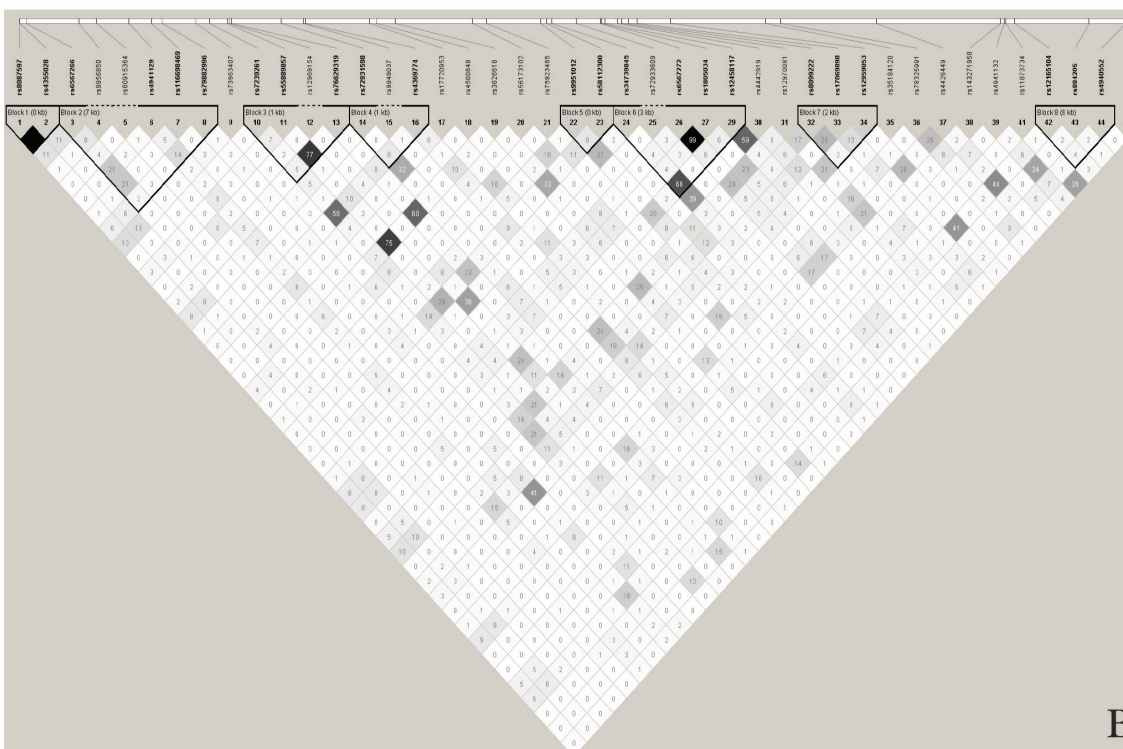
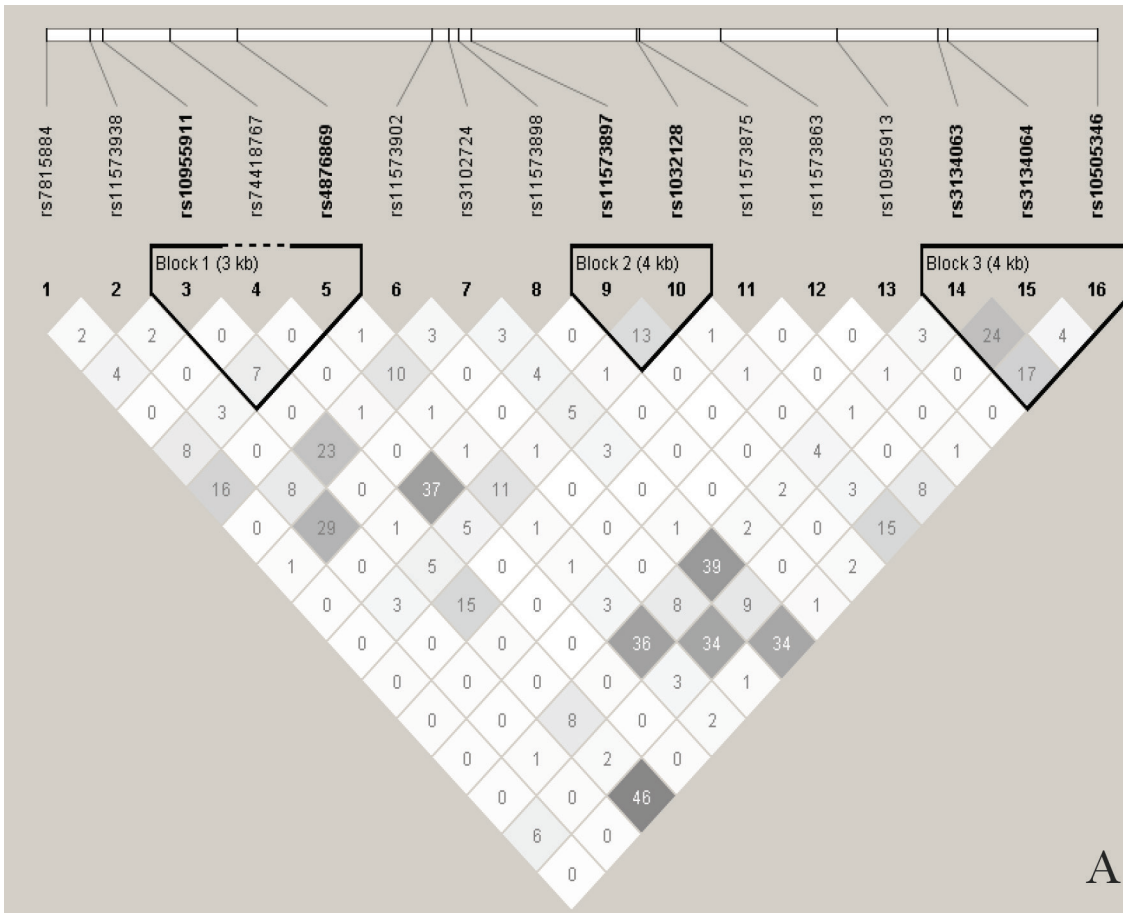
Legenda: ^acromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

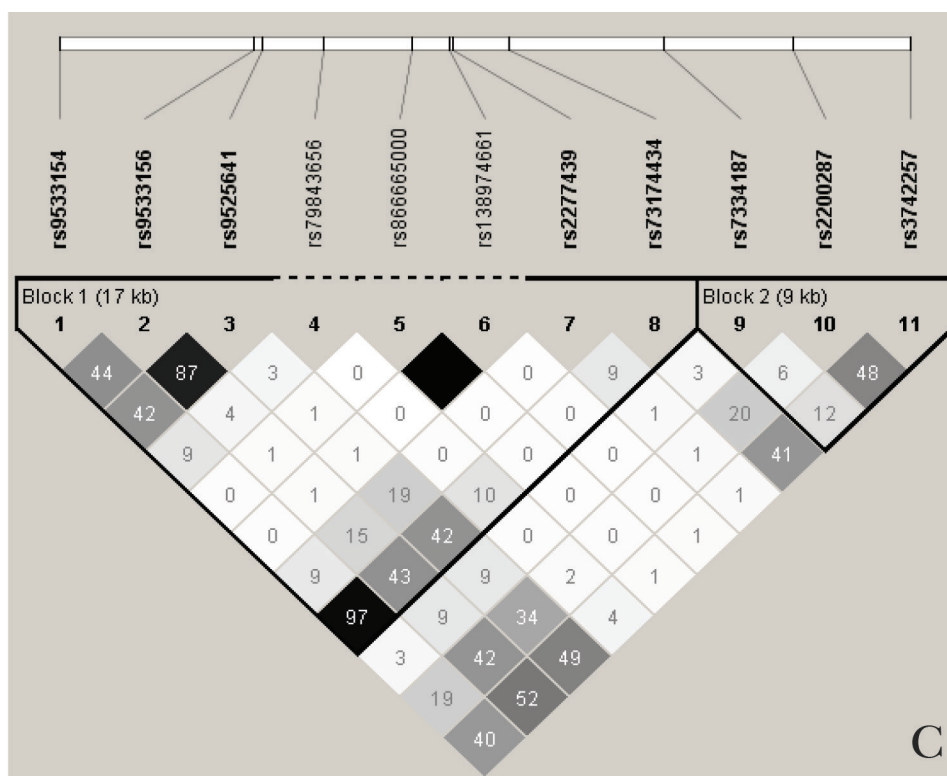
Na análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNP do *OPG* (Figura 1A), *RANK* (Figura 1B) e *RANKL* (Figura 1C), os resultados são apresentados em valores percentuais. Na análise do r^2 , resultados superiores a 80% ($r^2 \geq 0,8$) indicam alta correlação, sendo considerados como um forte desequilíbrio de ligação. Nos SNP estudados, no gene *OPG*, não houve polimorfismos em desequilíbrio de ligação (Figura 1A). No gene *RANK*, alguns polimorfismos

apresentaram valores que indicam alta correlação entre si: rs8087597 e rs4355028 ($r^2=1,0$), rs6567272 e rs1805034 ($r^2=0,99$). Os polimorfismos rs55889857 e rs76629319 apresentaram média correlação ($r^2=0,77$), assim como os polimorfismos rs55889857 e rs3826618 ($r^2=0,75$) (Figura 1B). Para o gene *RANKL*, os polimorfismos em desequilíbrio de ligação que tiveram alta correlação entre si foram: rs866665000 e rs138974661 ($r^2=1,0$), rs9533154

e rs73174434 ($r^2=0,97$), rs9533156 e rs9525641 ($r^2=0,87$) (Figura1C).

Figura 1 – Desequilíbrio de ligação em pares nos genes *OPG* (A), *RANK* (B) e *RANKL* (C). Haploview utilizando o r^2 onde a intensidade da cor dos quadrados e o valor mostram a força dos valores de r^2 em uma escala em que quadrados sólidos em preto ($r^2 \geq 0,8$) expressam alta correlação, em tons de cinza expressam correlação intermediária e em branco mostram baixa correlação.





Fonte: Dados da pesquisa.

Analisaram-se os polimorfismos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* que não estavam em desequilíbrio de ligação quanto ao diferencial de frequências alélicas (δ) de populações pseudoancestrais de africanos (YRI), europeus (CEU) e ameríndios (CHB), com a finalidade de identificar os AIM. Os dados foram apresentados na Tabela 4. Após a análise do diferencial de frequências alélicas, dos 55 polimorfismos genéticos referentes aos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL*, somente 9 se caracterizaram como AIM, sendo

que 2 polimorfismos em *RANK* distinguem CHB para 2 pseudoancestrais YRI ou CEU (rs6567266 e rs12969154); já os demais polimorfismos em *RANK* distinguem YRI de CHB (rs4500848), YRI de CEU (rs58112300) e CEU de CHB (rs4426449). Para o gene *OPG*, 3 polimorfismos distinguem YRI de CEU (rs4876869, rs3102724, rs3134063) e 1 distingue CEU de CHB (rs1032128). Para o gene *RANKL*, nenhum polimorfismo se caracterizou como AIM.

Tabela 4 – Diferencial de frequências alélicas entre três populações diferentes do Projeto 1000 Genomas para os marcadores genéticos do banco de dados do estudo.

SNP	Alelos ^a	Alelo referência ^a	OPG			δ^b	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
			Frequência do alelo referência ^a	YRI ^c	CEU ^d				
rs7815884	C/T	C	0,727	1,000	1,000	0,273	0,273	0,000	
rs11573938	C/T	C	0,949	0,854	0,995	0,095	0,046	0,141	
rs10955911	C/T	C	0,792	0,854	0,874	0,062	0,082	0,020	
rs74418767	G/A	G	0,963	1,000	1,000	0,037	0,037	0,000	
rs4876869	A/G	A	0,889	0,556	0,684	0,333	0,205	0,128	
rs11573902	T/G	T	0,944	1,000	1,000	0,056	0,056	0,000	
rs3102724	G/A	G	0,356	0,697	0,617	0,341	0,261	0,080	
rs11573898	C/T	C	1,000	0,914	1,000	0,086	0,000	0,086	
rs11573897	G/A	G	0,949	0,960	0,820	0,011	0,129	0,140	
rs1032128	G/A	G	0,634	0,737	0,427	0,103	0,207	0,310	
rs11573875	G/A	G	0,958	0,985	1,000	0,027	0,042	0,015	

SNP	Alelos ^a	Alelo referência ^a	OPG			δ^b		
			Frequência do alelo referência ^a			YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e			
rs11573863	A/T	A	0,940	1,000	1,000	0,060	0,060	0,000
rs10955913	G/A	G	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
rs3134063	C/T	T	0,838	0,485	0,563	0,353	0,275	0,078
rs3134064	T/A	T	0,847	0,944	0,879	0,097	0,032	0,065
rs10505346	G/T	G	0,602	0,808	0,879	0,206	0,277	0,071

RANK

SNP	Alelos ^a	Alelo referência ^a	Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs6567266	T/C	C	0,778	0,869	0,476	0,091	0,302	0,393
rs9956850	G/A	G	0,972	0,990	0,869	0,018	0,103	0,121
rs60915364	T/C	T	0,977	1,000	0,762	0,023	0,215	0,238
rs4941129	T/C	T	0,403	0,687	0,592	0,284	0,189	0,095
rs116698469	A/G	A	0,917	0,995	1,000	0,078	0,083	0,005
rs79882996	C/T	C	1,000	0,773	0,995	0,227	0,005	0,222
rs73963407	A/G	A	0,727	0,919	0,942	0,192	0,215	0,023
rs7239261	A/C	C	0,690	0,576	0,762	0,114	0,072	0,186
rs12969154	G/A	G	0,991	0,975	0,646	0,016	0,345	0,329
rs72931598	C/T	C	0,926	0,707	0,985	0,219	0,059	0,278
rs9949037	C/A	C	0,981	1,000	1,000	0,019	0,019	0,000
rs4369774	A/C	C	0,519	0,545	0,641	0,026	0,122	0,096
rs17720953	G/A	G	0,875	0,742	0,981	0,133	0,106	0,239
rs4500848	T/C	C	1,000	0,934	0,670	0,066	0,330	0,264
rs56173102	G/A	G	0,912	0,929	0,995	0,017	0,083	0,066
rs75923485	C/T	C	0,935	1,000	1,000	0,065	0,065	0,000
rs9951012	G/A	G	0,736	0,793	0,714	0,057	0,022	0,079
rs58112300	T/C	T	0,588	0,995	0,772	0,407	0,184	0,223
rs34739845	A/G	A	0,991	0,919	0,718	0,072	0,273	0,201
rs72933609	T/C	T	1,000	0,965	1,000	0,035	0,000	0,035
rs12458117	G/A	G	0,972	0,879	0,714	0,093	0,258	0,165
rs4442919	C/G	C	0,898	0,889	0,718	0,009	0,180	0,171
rs12970081	G/A	G	0,685	0,763	0,767	0,078	0,082	0,004
rs17069898	A/G	G	0,685	0,419	0,451	0,266	0,234	0,032
rs12959053	C/T	C	1,000	0,823	0,995	0,177	0,005	0,172
rs35184120	G/A	G	0,977	1,000	1,000	0,023	0,023	0,000
rs4426449	C/T	C	0,880	0,646	0,995	0,234	0,115	0,349
rs143271958	T/A	T	0,991	1,000	1,000	0,009	0,009	0,000
rs4941132	A/T	T	0,782	0,646	0,641	0,136	0,141	0,005
rs11873734	A/G	A	0,894	0,995	1,000	0,101	0,106	0,005
rs12165104	G/A	G	0,968	0,702	0,995	0,266	0,027	0,293
rs884205	A/C	C	0,958	0,758	0,801	0,200	0,157	0,043

SNP	Alelos ^a	Alelo referência ^a	OPG					
			Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs4940552	A/C	A	0,759	0,848	0,859	0,089	0,100	0,011
rs7236029	A/G	A	0,810	0,939	0,903	0,129	0,093	0,036

RANKL								
SNP	Alelos ^a	Alelo referência ^a	Frequência do alelo referência ^a					
			Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs79843656	G/A	G	1,000	0,949	1,000	0,051	0,000	0,051
rs2277439	G/A	A	0,801	0,859	0,723	0,058	0,078	0,136
rs7334187	T/G	T	0,847	1,000	1,000	0,153	0,153	0,000
rs2200287	G/A	G	0,713	0,626	0,762	0,087	0,049	0,136
rs3742257	T/C	C	0,514	0,439	0,515	0,075	0,001	0,076

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^aDados provenientes da base de dados do Projeto 1000 Genomas; ^bDiferença entre frequências alélicas de populações da base de dados do Projeto 1000 Genomas; ^cIndivíduos iorubas de Ibadan, Nigéria (YRI); ^dIndivíduos residentes de Utah nos Estados Unidos, que possuem ancestralidade europeia setentrional e ocidental (CEU); ^eChineses da etnia han de Pequim, China (CHB).

A Tabela 2 descreve detalhes dos polimorfismos genéticas em *OPG* e *RANK* que apresentaram AIM maiores que 30%. Os SNP em *OPG* apresentaram MAF que variou de 46 % para o alelo A no rs3102724, 31% para o alelo G no rs3134063, 29% para o alelo A no rs1032128 e 25% para

o alelo G no rs4876869. Já os SNP em *RANK* tiveram MAF de 25% para o alelo A no rs4426449, 24% para o alelo G no rs58112300, 19% para o alelo A no rs6567266, 5% para o alelo A no rs12969154 e 2% para o alelo A no rs4500848. Todos os polimorfismos são intrônicos.

Tabela 5 – Descrição dos polimorfismos em *OPG* e *RANK* com AIM maiores que 30%. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF) e função.

CHR ^a	Gene	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	Função
8	OPG	rs4876869	G	A	0.25	intron
8	OPG	rs3102724	A	G	0.46	intron
8	OPG	rs1032128	A	G	0.29	intron
8	OPG	rs3134063	G	A	0.31	intron
18	RANK	rs6567266	A	G	0.19	intron
18	RANK	rs12969154	A	G	0.05	intron
18	RANK	rs4500848	A	G	0.02	upstream_transcript, intron, genic_upstream_transcript
18	RANK	rs58112300	G	A	0.24	intron
18	RANK	rs4426449	A	G	0.25	intron

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Mecanismos de regulação foram atribuídos aos SNP analisados e identificados com “sim” ou “não” na Tabela 6. Os rs6567266 e rs58112300 estão envolvidas em regulação proximal. Nenhum dos polimorfismos está envolvido em regulação distal e nem em regulação miRNA. A regulação mediada por proteína de ligação a RNA foi um mecanismo associado a todos os SNP. Na mesma tabela, apresentaram-se dados regulatórios e funcionais

pontuados através de *score* pelo RegulomeDB para cada SNP. Os escores mais baixos – 1f do rs3134063 e 2b do rs12969154 – indicam que esses SNP podem estar envolvidos em regiões reguladoras e funcionais. Os escores mais altos – 4 (rs4876869, rs6567266 e rs4500848), 5 (rs58112300) e 7 (rs3102724, rs1032128 e rs4426449) – significam que provavelmente esses polimorfismos não estão envolvidos diretamente em processos funcionais.

Tabela 6 – Função dos SNP em *OPG* e *RANK* a partir de análises *in silico*, utilizando *rSNPBase* e *RegulomeDB*.

SNP	Regulação proximal	Regulação distal	Regulação miRNA	Regulação mediada por proteína de ligação a RNA	RegulomeDB (Score)
rs4876869	não	não	não	sim	4
rs3102724	não	não	não	sim	7
rs1032128	não	não	não	sim	7
rs3134063	não	não	não	sim	1f
rs6567266	sim	não	não	sim	4
rs12969154	não	não	não	sim	2b
rs4500848	não	não	não	sim	4
rs58112300	sim	não	não	sim	5
rs4426449	não	não	não	sim	7

Fonte: Dados do estudo.

DISCUSSÃO

Esse estudo descreveu a frequência de polimorfismos genéticos e probabilidade regulatória dos polimorfismos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL*, em uma população da região Nordeste do Brasil, juntamente com a análise da distribuição de frequências de populações pseudoancestrais, onde os polimorfismos já foram descritos anteriormente e associados a diversas doenças. A ancestralidade africana (YRI) é a predominante na população de Salvador, com média de 50,5%, seguida pelos europeus (CEU) com média de 42,4% e por último os americanos nativos (CHB), com média de 5,8% (LIMA-COSTA *et al.*, 2015).

Um dos genes estudados nessa população foi a osteoprotegerina (*OPG*), receptor da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), produto do gene *TNFRSF11B*, importante regulador negativo da osteoclastogênese, secretada por osteoblastos e células estromais. Polimorfismos nesse gene foram associados à osteoporose e risco de fratura óssea (VIDAL; FORMOSA; XUEREB-ANASTASI, 2011). Alguns polimorfismos genéticos em *OPG* apresentaram-se como AIM neste estudo (Tabela 4), sendo eles rs4876869, rs3102724, rs1032128 e rs3134063. O rs4876869 foi relacionado à densidade mineral óssea numa maioria de mulheres pós-menopausa, em uma coorte de 721 espanholas, e os resultados observaram a associação do polimorfismo rs4876869 (A >G) localizado no íntron 2 do gene *TNFRSF11B* à densidade mineral óssea (principalmente no colo do fêmur), porém não foi estatisticamente significativa. As mulheres com os genótipos GG / GA tenderam a ter melhores parâmetros ósseos no colo do fêmur, porém sem significância estatística (PANACH *et al.*, 2013). Na presente população, a frequência do menor alelo G foi de 25% e do alelo ancestral A, 75% (Tabela 5). Já o polimorfismo genético rs3102724 em *OPG* teve seu alelo A associado à reabsorção externa apical da raiz dental em pacientes brancos das regiões Sul e Sudeste do Brasil, com média de idade de 14,9 anos, tratados ortodonticamente de maloclusão de classe II (CASTILHOS *et al.*, 2019). Na

população estudada, a presença do alelo A foi bastante relevante, mostrando uma frequência de 46% (Tabela 5). Esse mesmo polimorfismo também foi associado à baixa densidade óssea mineral na coluna lombar em homens de centros europeus, com a frequência de 35% do alelo polimórfico A, porém, sem significância estatística (ROSHANDEL *et al.*, 2011). Em relação ao rs1032128 em *OPG* que na população estudada teve a frequência do menor alelo A de 29% (Tabela 5), foi relacionado com diversas doenças, como pé diabético, numa população polonesa, onde o alelo A foi considerado alelo de risco para essa condição patológica (MROZIKIEWICZ-RALOWSKA *et al.*, 2018). O mesmo polimorfismo apresentou relação com o desenvolvimento da osteoporose da cabeça femoral, induzida por álcool, em um modelo recessivo, no genótipo GG, também numa população chinesa (LI *et al.*, 2016), bem como efeito negativo do menor alelo G para a osteoartrite de joelho numa população chinesa (QI *et al.*, 2019). O alelo ancestral G na população deste estudo teve frequência de 71% (Tabela 5). Outro polimorfismo genético encontrado em *OPG*, o SNP rs3134063, foi analisado em uma pesquisa para 2027 pacientes espanhóis com artrite reumatoide, porém não foi observada associação entre polimorfismos do gene *OPG* e doença cardiovascular em todo o grupo de pacientes (GENRE *et al.*, 2014).

Outro gene pesquisado neste estudo, o *RANK*, liga-se ao receptor-ativador do fator nuclear-ligante κ B (*RANKL*) na superfície dos precursores de osteoclastos, desencadeando a osteoclastogênese (IKEBUCHI 2018). Cinco polimorfismos genéticos em *RANK* apresentaram-se como AIM no presente estudo: rs6567266, rs12969154, rs4500848, rs58112300 e rs4426449 (Tabela 4). Estudo envolvendo 501 mulheres chinesas na pós-menopausa, com osteoporose ou osteopenia, que receberam alendronato (70 mg por semana) por via oral por um ano, mostrou que o haplótipo AG do rs12969154, em *RANK*, foi fator de proteção genética em relação a uma densidade mineral

óssea das vértebras L1 à L4 mais alta (ZHENG *et al.*, 2016). A frequência do alelo polimórfico A no presente estudo foi de 5% (Tabela 5). O rs12969154 apareceu num estudo que comparou mongóis com outras cinco populações: os chineses *han* em Pequim, China (CHB), os japoneses em Tóquio, Japão (JPT), uma população do norte e oeste da Europa (CEU), os iorubás em Ibadan, Nigéria (YRI) e uma população do noroeste da China. Mas não houve diferença estatisticamente significativa desse SNP entre essas populações. A frequência do menor alelo A para o rs12969154 na população genotipada da Mongólia e do noroeste da China foi de 35,5% (WANG *et al.*, 2016). Para o SNP rs4500848, encontrou-se associação com a idade em que mulheres chinesas entraram na menopausa. Os indivíduos com o genótipo T / T tiveram um início mais precoce da menarca em 0,59 anos do que aqueles com o genótipo C / C. Se esta acontece muito cedo, a mulher tem maior risco de desenvolver câncer de mama e ovário, problemas metabólicos e diabetes tipo 2. Já a menopausa tardia oferece um maior risco de osteoporose (DUAN *et al.*, 2015). Outro polimorfismo genético em *RANK*, o rs4426449, foi analisado em diversos estudos, nas mais diversas populações, como na associação com a altura do adulto em chineses (CHEN *et al.*, 2007), idade da menopausa em mulheres brancas americanas (Y *et al.*, 2010) e obesidade em chineses (ZHAO *et al.*, 2006), mas não mostrou correlação com nenhum dos desfechos estudados.

CONCLUSÃO

“Identificaram-se diversos polimorfismos genéticos nos genes *OPG*, *RANK*, *RANKL*, com variadas frequências, e tiveram seus alelos mais frequentes associados às populações pseudoancestrais da população brasileira como marcadores de ancestralidade, com predomínio nas populações YRI (africanos) e CEU (europeus). Entre os polimorfismos que se caracterizaram com marcadores de ancestralidade, o rs3134063 do gene *OPG* e o rs12969154 do gene *RANK* mostraram-se como possivelmente envolvidos em regiões reguladoras e funcionais desses genes, podendo impactar na transcrição da proteína que codificam. Esses polimorfismos foram associados a diversos desfechos em outras populações, como padrão da densidade óssea mineral, pé diabético, osteoartrite, osteoporose, artrite reumatoide e idade em que as mulheres entraram na menopausa. Outros estudos que pesquisem a frequência de polimorfismos genéticos nos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* são necessários, visto que esses genes participam de inúmeros processos fisiológicos e patológicos.

REFERÊNCIAS

BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 263-265, 15 Jan. 2005.

BOYLE, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, New York, v. 22, n.

9, p. 1790-1797, 1 Sept. 2012.

CASTILHOS, B. B. de *et al.* Association of clinical variables and polymorphisms in *RANKL*, *RANK*, and *OPG* genes with external apical root resorption. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, [s.l.], v. 155, n. 4, p. 529-542, Apr. 2019.

CHEN, Y. *et al.* Variations in *RANK* gene are associated with adult height in Caucasians. **American Journal of Human Biology**, New York, v. 19, n. 4, p. 559-565, 2007.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 79, n. 8S, p. 1569-1576, 2008.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 7, p. 481-490, July 2010.

DUAN, P. *et al.* Gene polymorphisms in *RANKL*/*RANK*/*OPG* pathway are associated with ages at menarche and natural menopause in Chinese women. **BMC women's health**, London, v. 15, p. 32, 13 Apr. 2015.

FAIRLEY, S. *et al.* The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. **Nucleic Acids Research**, London, v. 48, n. D1, p. D941-D947, 8 Jan. 2020.

FRIEDRICHS, S. *et al.* Filtering genetic variants and placing informative priors based on putative biological function. **BMC Genetics**, London, v. 17, n. 2, p. S8, 3 Feb. 2016.

GENRE, F. *et al.* Osteoprotegerin CGA haplotype protection against cerebrovascular complications in anti-CCP negative patients with rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e106823, 2014.

GUO, L.; WANG, J. rSNPBase 3.0: an updated database of SNP-related regulatory elements, element-gene pairs and SNP-based gene regulatory networks. **Nucleic Acids Research**, London, v. 46, n. Database, p. D1111-D1116, 4 Jan. 2018.

IKEBUCHI, Y. *et al.* Coupling of bone resorption and formation by *RANKL* reverse signalling. **Nature**, [s.l.], v. 561, n. 7722, p. 195-200, 2018.

KÖBERLE, B. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 90, n. 10, p. 2369-2388, 1 Oct., 2016.

LI, Y. *et al.* Osteoprotegerin polymorphisms are associated with alcohol-induced osteonecrosis of femoral head in Chinese Han population from Henan province. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 95, n. 4, p. 983-989, Dec. 2016.

LIMA-COSTA, M. F. *et al.* Genomic ancestry and ethnracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, 27 Apr. 2015.

LU, Y. *et al.* TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. **Menopause**, New York v. 17, n. 5, p. 1048-1054, 1 Sept. 2010.

MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA, B. *et al.* Selected *RANKL*/*RANK*/*OPG* system genetic variants in diabetic foot patients. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 287-296, Dec. 2018.

MU, W.; ZHANG, W. Chapter 8 – Molecular Approaches, Models, and Techniques in Pharmacogenomic Research and Development. *In*: LAM, Y-W. F.; CAVALLARI, L. H. (Eds.). **Pharmacogenomics**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 273-294.

NAKASHIMA, T.; HAYASHI, M.; TAKAYANAGI, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 23, n. 11, p. 582-590, Nov. 2012.

- OKAMOTO, K. *et al.* Osteoimmunology: The conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 97, n. 4, p. 1295-1349, 1 Oct. 2017.
- ONO, T. *et al.* RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. **Inflammation and Regeneration**, [s.l.], v. 40, 7 Feb. 2020.
- PANACH, L. *et al.* Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v. 32, n. 6, p. 691-698, Nov. 2014.
- QI, Y. *et al.* Association of OPG gene polymorphisms with the risk of knee osteoarthritis among Chinese people. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. e662, 2019.
- ROSHANDEL, D. *et al.* Influence of polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway on volumetric bone mineral density and bone geometry at the forearm in men. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 446-455, Dec. 2011.
- SHRIVER, M. D. *et al.* Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 957-964, Apr. 1997.
- SILVA, T. A. *et al.* Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, [s.l.], v. 105, n. 3, p. 333-341, 1 Mar. 2008.
- SILVA, T. M. da *et al.* The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 23, n. 7, p. 984-989, July 2015.
- TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 8, p. 638-649, Aug. 2003.
- VIDAL, C.; FORMOSA, R.; XUEREB-ANASTASI, A. Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v. 47, n. 3, p. 327-333, 1 Dec. 2011.
- ZHENG, H. *et al.* OPG, RANKL, and RANK gene polymorphisms and the bone mineral density response to alendronate therapy in postmenopausal Chinese women with osteoporosis or osteopenia. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v. 26, n. 1, p. 12-19, Jan. 2016.
- WANG, J. *et al.* Polymorphisms of genes in the OPG/RANKL/RANK pathway in the Mongols of Inner Mongolia China: Relationship to other populations. v. 9, p. 3851-3859, 29 Feb. 2016.
- ZHAO, L-J. *et al.* Is a gene important for bone resorption a candidate for obesity? An association and linkage study on the RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) gene in a large Caucasian sample. **Human Genetics**, Berlin, v. 120, n. 4, p. 561-570, 2 Nov. 2006.

Submetido em: 19/11/2021

Aceito em: 22/11/2021