

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA OSTEOPROTEGERINA (OPG) EM PACIENTES
DIABÉTICOS ASSOCIADOS À PERIODONTITE**

KEILA CRISTINA RAPOSO LUCENA

Recife – PE – Brasil

2011

KEILA CRISTINA RAPOSO LUCENA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA OSTEOPROTEGERINA (OPG) EM PACIENTES
DIABÉTICOS ASSOCIADOS À PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

Recife – PE – Brasil

2011

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

L935a Lucena, Keila Cristina Raposo.
Análise do polimorfismo da osteoprotegerina (OPG) em pacientes diabéticos associados à periodontite / Keila Crisina Raposo Lucena. – Recife: O autor, 2011.
54 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2011.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Diabetes. 2. Periodontite. 3. Osteoprotegerina. 4. Polimorfismo.
I. Carvalho, Alessandra de Albuquerque Tavares (Orientador). II. Título.

617.6

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-169)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof.Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – CORPO DOCENTE

Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Arnaldo de França Caldas Júnior

Anderson Stevens Leônidas Gomes

Carlos Menezes Aguiar

Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Danyel Elias da Cruz Peres

Edvaldo Rodrigues de Almeida

Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Geraldo Bosco Lindoso Couto

Jair Carneiro Leão

Jurema Freire Lisboa de Castro

Liriane Baratela Evêncio

Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Oziclere de Araújo Sena

TÍTULO: Análise do polimorfismo da osteoprotegerina (OPG) em pacientes diabéticos associados à periodontite

NOME: Keila Cristina Raposo Lucena

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 10/03/2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof. (a) Dr. (a) Liriane Baratella Evêncio

Prof. (a) Dr. (a) Daniela da Silva Feitosa

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Ata da 108ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 10 de março de 2011.

Às 9:00(nove horas) do dia 10(dez) do mês de março do ano de dois mil e onze, reuniram-se no auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. LIRIANE BARATELLA EVENCIO, atuando como presidente, Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA, atuando como primeiro examinador. Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS , atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA OSTEOPROTEGERINA (OPG) EM PACIENTES DIABÉTICOS ASSOCIADOS À PERIODONTITE”**, da CD. KEILA CRISTINA RAPOSO LUCENA, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação do Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Co-orientada pela Profa.Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA. Dando inicio aos trabalhos Profa.Dra. **ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO**, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a candidata para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se à disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA(**APROVADA**), Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS (**APROVADA**) Profa.Dra. LIRIANE BARATELLA EVENCIO (**APROVADA**), a candidata recebeu três conceitos(**APROVADA**) é considerada (**APROVADA**), devendo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do Curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, A Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada , Oziclere Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE. **KEILA CRISTINA RAPOSO LUCENA**.

Recife, 10 de março de 2011.

Profa.Dra. LIRIANE BARATELLA EVENCIO (Presidente)

Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA (1º Examinador)

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS (2º Examinador)

DEDICATÓRIA

“..... o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

*(Carlos Drummond de
Andrade)*

dedico este trabalho,

aos **meus pais, Aluisio e Fátima**, que me ensinaram verdadeiramente o que é amar sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pelos eternos ensinamentos, pela dedicação e confiança em mim depositadas, indispensáveis ao meu crescimento moral e fundamentais para esta minha conquista; e à **minha querida irmã Angeli** que, mesmo diante das dificuldades, nunca deixou de estar comigo e me apoiar. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida, que me permitiu chegar até aqui enfrentando com fé e coragem as adversidades do caminho e com alegria as vitórias conquistadas.

À Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins, por subsidiar toda a estrutura necessária à conclusão deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério de Educação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, através do projeto REUNI de Assistência ao Ensino;

À todos que fazem parte do Centro Médico Ermírio de Moraes, especialmente a Diretora Fernanda Pantoja e a funcionária Vanúcia dos Santos;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, agradeço pela orientação concedida e os conhecimentos transmitidos, bem como a compreensão e a paciência que permitiram a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira pela co-orientação e presteza;

Aos professores do Programa da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco pelos conhecimentos repassados, pelo respeito e pelo entusiasmo na forma de ensinar, que me fizeram valer à pena o esforço de estar aqui.

Aos meus tios Alba Lúcia e Marco Aurélio, agradeço imensamente o afeto e o carinho a mim prestados, e com os quais fui acolhida durante esta caminhada;

Aos meus amigos e amigas do curso de mestrado – Paulo Correia, Elizabeth Galamba, Érika Von Söhsten, Ludmilla Galindo, Raquel Balaban, Bruno Gama,

Edivânia do Vale, José Anderson Matos, Hugo Franklin, Marcelo Amaral, Randerson Cardoso, Roberta Natalie Santos e Tayguara Cerqueira, pelo convívio harmonioso;

Às amigas Mariana Perez e Thayse Rodrigues pela companhia, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho;

Aos funcionários da Pós-graduação em Odontologia, em especial à Oziclere Sena, Maria da Paz e Tânia Maria pela presteza e pelos momentos de descontração;

Aos pacientes, pela compreensão e confiança de valor inestimáveis;

À todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
------------------------------	----------

ARTIGO

Resumo.....	10
Abstract.....	10
1 Introdução.....	11
2 Materiais e métodos.....	13
2.1 Amostra.....	13
2.2 Parâmetros clínicos.....	14
2.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	14
2.4 Análise estatística.....	15
3 Resultados.....	15
4 Discussão.....	16
Referências.....	19

APÊNDICE

A – Ficha clínica

B- Termo de consentimento

ANEXO

A – Normas para publicação na revista Acta Odontologica Scandinavica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média, desvio padrão e mediana das variáveis: idade do paciente, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica segundo o grupo.....22

Tabela 2. Avaliação dos genótipos segundo a região polimórfica.....23

Tabela 3. Frequência dos alelos do gene da osteoprotegerina a região polimórfica.....24

Tabela 4. Média e desvio padrão da profundidade de sondagem segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo.....25

Tabela 5. Média e desvio padrão do percentual de sangramento à sondagem segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo.....26

Tabela 6. Média e desvio padrão do nível de inserção clínica segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo.....27

Análise do polimorfismo da osteoprotegerina (OPG) em pacientes diabéticos associados à periodontite

Analysis of osteoprotegerin polymorphisms in diabetic's patients associated with periodontitis

Keila Cristina Raposo Lucena¹; Renata Cimões Jovino Silveira²; Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho.³

¹Mestranda em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada pela Universidade Federal de Pernambuco, bolsista do Programa REUNI de Assistência ao Ensino (UFPE)

²Professora Adjunto do curso de Odontologia da UFPE e membro permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE

³ Professora Adjunto do curso de Odontologia da UFPE e membro permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE

Endereço para correspondência:

Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Av. Professor Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE

CEP: 50670-901. Email: at.carvalho@uol.com.br

RESUMO

OBJETIVO: Este estudo analisou a presença de polimorfismos na região promotora -163A/G, -245T/G e -950T/C do gene da osteoprotegerina (OPG), bem como a sua distribuição em pacientes diabéticos e com periodontite quando comparados ao grupo controle. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A pesquisa contou com a participação de 67 indivíduos distribuídos em um grupo teste (n=32), constituído por pacientes diabéticos e com periodontite, e outro controle (n=35) que incluíam pacientes não diabéticos e sem periodontite. Foram incluídos indivíduos entre 22 e 56 anos de idade com, no mínimo, 15 dentes presentes, que não faziam uso de medicação, exceto para a diabetes, e que não apresentavam outra doença sistêmica. Para o diagnóstico da periodontite, foram avaliados os parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, sendo sondados seis sítios em cada dente presente e diagnosticada a periodontite na presença de dois ou mais sítios com profundidade de sondagem igual ou superior à 4mm. O DNA para a investigação dos polimorfismos da OPG, através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, foi obtido a partir do soro sanguíneo dos participantes. **RESULTADOS:** Não foi observada associação entre polimorfismos da região promotora do gene da OPG em pacientes com periodontite e diabetes mellitus ($p>0,005$). O alelo mais freqüente no grupo teste foi o A163(81,2%), seguido pelo T245(75,0%) e pelo T950(54,7%). O alelo T950, possível marcador da osteoclastogênese, não foi associado à condição periodontal dos pacientes diabéticos ($p>0,005$). **CONCLUSÃO:** Neste estudo não houve associação entre polimorfismos genéticos da OPG em pacientes diabéticos e com periodontite ($p>0,005$).

Palavras-chave: diabetes, periodontite, osteoprotegerina, polimorfismo.

ABSTRACT

OBJECTIVES: The purpose of this paper was analyzed the presence of polymorphisms in the promoter region -163A/G, -245T/G e -950T/C of the osteoprotegerin (OPG) gene, as well as its presence in diabetic patients with periodontitis when compared to the control group. **MATERIAL AND METHODS:** A total of 67 individuals, divided between a test group (n=32), constituted by diabetic patients with periodontitis, and a control group (n=35), with non-diabetic patients without periodontitis. All selected individuals were between 21 and 55 years of age, with at least 15 tooth and in use of no medication but for diabetes control, free of any other systemic diseases. For the diagnosis of periodontitis, clinical parameters were evaluated: probing pocket depth, bleeding on probing and clinical attachment level. Six sites of each existing tooth were probed and periodontitis was diagnosed when two or more sites had a probing pocket depth of 4mm or higher. The DNA was prepared from serum for the investigation of OPG gene polymorphisms, through Polymerase Chain Reaction (PCR). **RESULTS:** There was no association between polymorphisms in the promoter region of the OPG gene in patients with periodontitis and diabetes mellitus ($p>0,05$), or of an association between these polymorphisms and chronic periodontitis, according to the clinical parameters studied. The T950 allele, a possible biomarker of osteoclastogenesis, was not associated with the periodontal condition of the diabetic patients ($p>0,05$). **CONCLUSION:** In this study there were no associations between OPG gene polymorphisms in diabetic patients with periodontitis.

Key-words: diabetes, periodontitis, osteoprotegerin, polymorphisms

1 INTRODUÇÃO

Evidências sugerem que a diabetes mellitus pode modular a destruição dos tecidos periodontais através da redução da sua função leucocitária incluindo a quimiotaxia, aderência e fagocitose, podendo também ser considerada como um fator de risco para a doença periodontal em virtude da incidência, progressão e severidade desta patologia em indivíduos diabéticos^{8, 14,18}.

A hiperglicemia sustentada gera conseqüências em quase todos os tecidos do organismo, pois afeta direta e indiretamente as células resultando em mudanças em sua estrutura funcional^{1,14}. Ainda conforme os autores, esta hiperglicemia também possui potencial para alterar o microambiente periodontal, o que pode contribuir para a patogênese da periodontite em pacientes diabéticos, sendo a doença periodontal sua sexta complicação clássica, segundo a Academia Americana de Diabetes.

A perda óssea alveolar, que é mediada pela resposta imune do hospedeiro contra o acúmulo do biofilme bacteriano, é um dos principais indicadores da periodontite²¹. A avaliação da perda do nível de inserção clínica periodontal, bem como a presença de bolsas periodontais é bastante utilizada para o diagnóstico desta condição patológica^{7,9}. Entretanto, novas modalidades de diagnóstico para a avaliação do início e da progressão da periodontite, também estão sendo utilizadas, como a identificação das concentrações de mediadores do metabolismo ósseo tais como a RANK, a RANKL e a OPG^{7,9,12}.

A OPG, também conhecida como Fator Inibidor da Osteoclastogênese (OCIF), é uma proteína ósseo reguladora, constitída por 5 éxons e com capacidade de inibir a resbsorção óssea, uma vez que tal proteína interage com a RANKL bloqueando a sua ligação com a RANK, proteínas responsáveis pela diferenciação e ativação dos osteoclastos e que estimulam o processo ósseo reabsortivo^{4,21,23}.

Diferenças nas proporções de RANKL/OPG podem estar relacionadas à severidade da doença periodontal^{7,8,12,13}. A importância da regulação destas

proteínas na destruição óssea tem sido demonstrada em vários estudos, onde um aumento nas concentrações de RANKL e uma redução nas concentrações de OPG podem indicar a ocorrência da periodontite^{3,11,13}. Em pacientes diabéticos, estudos apontam a presença de elevadas concentrações plasmáticas e salivares da OPG, embora tais concentrações apresentem-se reduzidas em indivíduos com diabetes mellitus e periodontite associadas^{7,8,12}.

Polimorfismo genético refere-se à existência de dois ou mais alelos em um determinado local do DNA, com uma frequência de alelos em mais de 1% da população, representando a forma mais comum de variação do DNA no genoma humano, onde mutações genéticas têm sido implicadas na argumentação de um complexo de doenças².

Langdahl et al.¹⁰ (2002) identificaram 12 diferentes polimorfismos no gene da OPG, incluindo em sua região promotora correspondente às posições -163A/G, -245T/G e -950T/C, onde esta identificação pode proporcionar uma ferramenta de valor diagnóstico para a avaliação de risco da periodontite¹⁷. Estudos realizados para analisar a associação destes polimorfismos com a periodontite não têm indicado correlação com a periodontite crônica ou a periodontite agressiva^{2,17,19,23,24}. No entanto, vários estudos identificaram polimorfismos no gene da OPG associados à doenças cardiovasculares²⁴, fraturas ósseas¹² e osteoporose²⁶ em diferentes populações.

Embora a literatura demonstre a relevância que a atividade biológica de uma variedade de citocinas, a exemplo da OPG, exerce na destruição periodontal de indivíduos diabéticos, os seus mecanismos ainda não foram completamente elucidados. Tendo em vista o grande impacto exercido por esta doença sobre os tecidos periodontais e a possível influência da OPG na periodontite, foi proposta deste estudo analisar o polimorfismo genético desta proteína associando-o à periodontite em indivíduos diabéticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

O presente estudo foi do tipo experimental cuja amostra de conveniência foi composta por 67 participantes assim distribuídos: 32 indivíduos diabéticos tipo 2 e com periodontite (grupo teste), e 35 indivíduos não diabéticos e sem periodontite (grupo controle). Eles foram atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes, na cidade de Recife – PE, e na clínica de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os princípios éticos que envolvem pesquisas com seres humanos foram obedecidos e a pesquisa foi iniciada mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE sob o protocolo número 088/09.

A população estudada tinha a faixa etária compreendida entre 22 e 56 anos de idade, incluindo homens e mulheres que apresentavam, no mínimo, 15 dentes, de acordo com estudos de Costa et al.,⁷ (2010) e Lappin et al.¹² (2009).

2.2 Parâmetros clínicos

No exame clínico periodontal, foram avaliados a profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, sendo examinados seis sítios em cada dente. Foram considerados pacientes com periodontite aqueles com profundidade de sondagem maior ou igual a 04 mm em mais de um sítio examinado¹², conforme critérios estabelecidos pela AAP (Academia Americana de Periodontologia).

Foram excluídos da pesquisa indivíduos fumantes; grávidas ou lactentes; indivíduos que faziam uso de antibióticos ou que se submeteram à tratamento periodontal nos últimos 6 meses; tratamento médico para condições sistêmicas, exceto para o diabetes; maiores complicações do diabetes (retinopatia, neuropatia, nefropatia e aterosclerose). Os indivíduos diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 apresentavam a doença há pelo menos 5 anos⁷.

2.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído do soro sanguíneo dos participantes utilizando o kit DNA blood mini kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Reação de cadeia em polimerase (PCR)

Um fragmento com 348 pares de base (pb) de cada genótipo analisado na região promotora do gene da OPG foi amplificado pela técnica da PCR convencional, sendo realizada em um volume total de 25µL contendo 12,5 µL de mix (Top Taq Polymerase - Qiagen), 0,6 µL de cada primer (Tabela 1) e 4 µL de DNA. As amplificações foram realizadas com 35 ciclos de desnaturação à 96°C por 45s; temperaturas de anelamento para cada primer conforme tabela 1 por 45s; extensão à 72°C por 45s com desnaturação inicial à 96°C por 5 min e extensão final à 72°C por 10 min, conforme Park et al.¹⁷ (2008).

2.5 Detecção do comprimento dos fragmentos amplificados após digestão pela enzima de restrição (PCR-RFLP) (Regiões A163G/T245G, T950C)

A técnica RFLP foi realizada em um volume total de 20µL utilizando 8U das enzimas de restrição *Hinfl*, *VspI* e *HincII* (Promega), respectivamente, e 8µL do produto da PCR digeridos à 37°C por 2hs. Os produtos digeridos foram separados em gel de agarose à 3%.

A RFLP é formada por uma base de transição (A/G) para o genótipo A163G; (T/G) para o genótipo T245G; e outra (T/C) para o genótipo T950C do gene da OPG que cria um sítio de restrição específico para cada enzima. Os alelos resultantes da clivagem da enzima *Hinfl*, são designados “A” para aqueles que não contem sítio de restrição para a enzima, apresentando um fragmento de 348pb, ou “G” para aqueles que contem o sítio de restrição apresentando um fragmento de 64pb e outro de 284pb. Os produtos da clivagem da *VspI* resultam em um alelo “T”, apresentando um fragmento de 348pb e um alelo “G” com dois fragmentos de 153pb e 195pb. Por fim, a enzima *HincII* resulta em alelo “T”, com sítio ausente para a enzima e outro alelo “C” com sítio presente com dois fragmentos de 64pb e 284pb.

2.6 Análise estatística

As prevalências dos genótipos e dos alelos entre o grupo teste e o grupo controle foram analisadas utilizando o teste do Qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste Exato de Fischer. Para verificar a associação entre os genótipos e os parâmetros clínicos, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste e F (ANOVA) com comparações de Tukey, sendo considerados resultados significantes aqueles com o valor de $P < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 15.

3 RESULTADOS

A tabela 2 apresenta as frequências quanto ao gênero, tabagismo e tempo de abandono do hábito com resultados significativos para as duas últimas categorias. Quanto ao tempo de abandono do tabagismo, a maior variação ocorreu entre aqueles que cessaram o hábito há mais de um ano.

Os parâmetros clínicos profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, bem como a média de idade, foram analisados nos dois grupos (Tabela 3). As médias de cada uma das variáveis foram correspondentemente mais elevadas no grupo teste do que no grupo controle com diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$).

A associação entre a idade e os parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica) está registrada na tabela 4. Com exceção da correlação entre idade e sangramento à sondagem no grupo controle, que apresentou valor negativo, as outras correlações foram todas positivas. No grupo teste, as variáveis profundidade de sondagem e nível de inserção clínica apresentaram correlações significativamente diferentes de zero para a margem de erro 5,0%, enquanto que no grupo controle, a única correlação significativa foi com o sangramento à sondagem. As duas maiores correlações com a idade foram sangramento à sondagem no grupo controle ($r = 0,487$) e nível de inserção clínica no grupo teste ($r = 0,477$).

Após a análise da PCR, pôde-se observar mutações nas regiões -245T/G e -950T/C. Estas mutações foram representadas pela presença de duas bandas nos respectivos genótipos caracterizando um portador homozigoto (GG)T245G e (CC)T950C, embora tais mutações não tenham sido estatisticamente significantes ($p>0,05$), ocorrendo tanto no grupo controle como também no grupo teste, onde a maior variação foi registrada no genótipo T245G ($p=0,850$) (Tabela 5).

Assim como a distribuição genotípica, a distribuição dos alelos também não mostrou resultados significativos quanto à associação entre a doença periodontal e a diabetes mellitus. A distribuição dos alelos está sumarizada na tabela 6.

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados comparativos entre as regiões polimórficas e os parâmetros clínicos profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, respectivamente. A tabela 7 apresenta os resultados comparativos entre as regiões polimórficas em relação à profundidade de sondagem, observando-se a ocorrência de duas diferenças significativas no grupo controle nas regiões -245T/G e -950T/C. A média da profundidade de sondagem, neste grupo, foi menos elevada no genótipo GG da região -245T/G e foi mais elevado no genótipo TT desta região. Na região -950T/C, a média menos elevada ocorreu no genótipo TT, sendo mais elevada e aproximada quando ocorreram TC ou CC. Na tabela 8, estão registradas as informações sobre as comparações entre os genótipos e o sangramento à sondagem, onde não foram obtidos resultados significativos. Por fim, na tabela 9 encontram-se os resultados comparativos entre os genótipos e o nível de inserção clínica, apresentando resultado significativo apenas o grupo controle na região polimórfica -245T/G.

4 DISCUSSÃO

Para a realização de estudos de frequência genética, é importante que os dados demográficos, como a idade e a etnia, e o status da doença estudada tenham similaridade entre os grupos estudados. Nesta pesquisa, participaram indivíduos geneticamente heterozigotos, com periodontite crônica e que apresentaram média de idade mais elevada no grupo teste quando comparada

ao controle. Tal diferença na idade ocorreu em virtude de o exame clínico periodontal, no grupo teste, ter sido realizado em um centro de referência para o tratamento da diabetes, onde a média de idade dos indivíduos ali atendidos era mais elevada do que naqueles que não eram portadores da doença. Este fato foi refletido em nosso estudo, onde os parâmetros clínicos, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, foram estatisticamente significativos em indivíduos com média de idade mais alta. Exceção feita ao sangramento à sondagem que foi mais significativo no grupo controle. No entanto, este parâmetro não é muito utilizado para o diagnóstico da doença periodontal, comparado aos dois parâmetros supracitados.

Indivíduos fumantes foram excluídos deste estudo uma vez que o tabagismo pode exercer um papel modulador na doença periodontal. No entanto, indivíduos ex-fumantes há mais de 8 meses foram incluídos na pesquisa pois estudos demonstram que, após algumas semanas do abandono do hábito, ocorre uma redução na profundidade de sondagem e melhoras no padrão cicatricial dos tecidos periodontais⁶.

Embora a associação, a alta prevalência e a incidência da doença periodontal em pacientes diabéticos seja conhecida, poucos estudos têm sido conduzidos para o reconhecimento de marcadores genéticos para estas condições patológicas. Lappin et al.¹² (2009) observaram em seus experimentos que pacientes diabéticos podem apresentar dificuldades em sua substituição óssea sugerindo que defeitos na formação óssea poderiam implicar na progressão da periodontite nestes indivíduos.

Duarte et al.⁸ (2007), estudando o papel modulador da diabetes em indivíduos com periodontite crônica, sugeriram que a referida patologia poderia exercer tal efeito através da inibição da produção de OPG, favorecendo assim, o processo ósteo-reabsortivo. Entretanto, conforme os experimentos de Costa et al.⁷. (2010), pacientes portadores de diabetes e doença periodontal apresentam elevadas concentrações salivares de OPG podendo tal fato estar relacionado ao envolvimento vascular, muito comum em decorrência da diabetes, onde as elevadas concentrações de OPG podem representar um

mecanismo de defesa contra calcificações arteriais e outras formas de prejuízos vasculares.

O presente estudo investigou a possível associação dos polimorfismos na região promotora do gene da OPG em pacientes diabéticos associados à sua condição periodontal, não observando resultados significativos para esta associação, inclusive quando associados aos parâmetros clínicos isoladamente. Wagner et al.²³ (2007) também não encontraram esta associação. No entanto, estes autores estudaram a associação da periodontite com polimorfismos nos éxons do gene da OPG enquanto o nosso foi concentrado no estudo da sua região promotora.

Também avaliando a associação de polimorfismos na OPG em pacientes com periodontite, Soedarsono et al.¹⁹ (2006) não verificou associação estatisticamente significante. Entretanto, os referidos autores estudaram uma população com periodontite agressiva diferindo do nosso estudo que avaliou indivíduos com periodontite crônica, uma vez que estes, além de apresentar diabetes mellitus, também possuíam uma média de idade mais elevada, incomum aos pacientes portadores de periodontite agressiva.

Existem poucos estudos que associam polimorfismos na região promotora do gene da OPG com a periodontite. Baioni et al.² (2008) e Park et al.¹⁷ (2008) não observaram a associação de polimorfismos na região -950T/C com a periodontite, corroborando com os nossos achados. Os primeiros autores também avaliaram a associação de polimorfismos desta região em pacientes com periodontite e doença renal crônica, não observando tal associação. Em nossos estudos, esta associação também não foi encontrada quando avaliados indivíduos com diabetes mellitus e periodontite.

Em concordância com nossos resultados, Park et al.¹⁷ (2008) e Wohlfahrt et al.²⁴ (2006) e não encontraram associação entre a periodontite e polimorfismos na região -245T/G. Porém, em nossa pesquisa, dois indivíduos do grupo controle apresentaram mutações nesta região (GG) e tais mutações, quando associadas à profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, apresentaram valores significativos ($p=0,010$ e $p=0,024$, respectivamente). Tal

associação pode ter ocorrido em virtude do pequeno número de indivíduos que apresentaram a mutação refletindo, assim, na variação estatística.

Embora não haja um consenso na literatura, alguns estudos sugerem uma associação do alelo T950 com o aumento da atividade osteoclástica. Park et al.¹⁷ (2008) indicaram, em seus relatos, uma maior prevalência e significância do alelo T950 em pacientes com periodontite, o que não foi verificado em nosso estudo. Contudo, os primeiros autores estudaram indivíduos coreanos, geneticamente homozigotos, em contrapartida ao nosso grupo de estudo, composto por uma população geneticamente heterozigota, assim como estudada por Baioni et al.² (2008) que também não encontraram associação entre o referido alelo e a periodontite crônica.

A associação de polimorfismos da OPG com outras doenças sistêmicas como a osteoporose, doenças renais, vasculares e com a menopausa tem sido estudada com frequência. Ohmori et al.¹⁵ (2002) e Vidal et al.²² (2006) têm estudado a associação do alelo T950 com a osteoporose. Baioni et al.² (2008) estudaram a associação de polimorfismos na região -950T/C com doenças renais crônicas e o alelo C950 tem sido associado às doenças cardiovasculares conforme Brandstrom et al.⁵ (2002) e Solfi et al.²⁰ (2004). Esta última associação deve ser mais bem investigada, uma vez que a periodontite também pode ser considerada como um importante fator de risco para este grupo de doenças.

Os resultados da presente pesquisa não mostraram associação entre polimorfismos genéticos da OPG em pacientes diabéticos e com periodontite quando comparados a pacientes não diabéticos e sem doença periodontal. No entanto, outros estudos devem ser realizados tendo em vista a alta incidência, a progressão e a severidade da doença periodontal em pacientes diabéticos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – e pelo Programa REUNI de Assistência ao Ensino.

REFERÊNCIAS

- 1- Andersen CCP, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodents studies. **J Periodontol**, 78(7):1264-1275, 2007.
- 2- Baioni CS, Souza CM, Ribeiro APB, Luczyszyn SM et al. Analysis of the association of polymorphism in the osteoprotegerin gene with susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. **J Periodont Res** 2008; 43:578-84.
- 3- Belibasakis NG, Bostanci N, Hashim A, Johansson A et al. Regulation of RANKL and OPG gene expression: in human gingival fibroblast and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. **Microbiol Pathogenesis**, 43:46-53, 2007.
- 4- Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, 9(Suppl 1):1-7, 2007.
- 5- Brandstrom H, Stiger F, Lind L, Kahan T, et al. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. **Biochem Biophys Res Commun**, 293:13-17, 2002.
- 6- Cezar Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Nociti Jr FH. Relação entre doença periodontal e tabagismo. In: Paiva JS, Almeida RV. **Periodontia – a atuação clínica baseada em evidências**. Artes Médicas Ltda, 2005, p.323-333.
- 7- Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8 and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. **J Periodontol**, 81(3):384-391, 2010.
- 8- Duarte PM, Neto JBG, Casati MZ, Sallum EA et al. Diabetes modulates gene expression in the gengival tissues of patients with chronic periodontitis. **Oral Diseases**, 13:594-599, 2007.
- 9- Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV et al. BNone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. **J Periodontol**, 79:1913-1919, 2008
- 10- Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Crixsen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated wiyh osteoporotic fractures. **J Bone Miner Res**, 17:1245-1255, 2002
- 11- Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive therapy periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, 34:271-277, 2007

- 12- Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, et al. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. **J Clin Periodontol**, 36:634-641, 2009.
- 13- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **J Dent Res**, 83(2):166-9, 2004
- 24- Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic American with type 2 diabetes. **J Periodontol**, 79:629-636, 2008.
- 15- Ohmori H, Makita Y, Funamizu M. Linkage association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. **J Hum Genet**, 47:400-406, 2002.
- 16- O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C, Devlin N, et al. Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, 26:496-502, 2010.
- 17- Park O-J, Shin S-Y, Choi Y, Kim M-H. et al. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. **Oral Diseases**, 14: 440-444, 2008.
- 18- Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and Peri-implant conditions: update on associations and risks. **J Clin Periodontol**, 35(Suppl. 8):398-409, 2008.
- 19- Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. **J Periodontol Res**, 41:397-404, 2006.
- 20- Solfi M, Schoppet M, Sattler AM et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. **J Clin Endocrinol Metab**, 89:3764-3768, 2004.
- 21- Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol**, 76:2033-2041, 2005.
- 22- Vidal C, Brincat M, Xuereb AA. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. **Maturitas**, 53:386-395, 2006.
- 23- Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, 34:823-827, 2007

24- Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, et al. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. **J Periodontol**, 77:426-436.

TABELAS

Tabela 1- Sequência de primers para a amplificação do gene da OPG

Região promotora	Primers (5' → 3')	Temperaturas de anelamento
-163A/G, -245T/G	F- AACTTGAACACTTGGCCCTGA R- AAATTGGACTGCCTGGGG	60°C
-950T/C	F- GTTCCTCAGCCCGGTGGCTTTT R- TGTGGTCCCCGGAACTTCAGG	64°C

FONTE: Park et al. (2008).

Tabela 2 – Características da amostra segundo o grupo

Variável	Grupo				Valor de p
	Teste		Controle		
	n	%	n	%	
TOTAL	32	100,0	35	100.0	
• Gênero					
Masculino	8	25,0	15	42,9	p ⁽¹⁾ = 0,124
Feminino	24	75,0	20	57,1	
• Hábito de tabagismo					
Fumante	-	-	-	-	p ⁽²⁾ < 0,001*
Ex-fumante	10	31,2	-	-	
Nunca fumou	22	68,8	35	100,0	
• Tempo tabagismo entre os ex-fumantes					
Até um ano	1	3,1	-	-	p ⁽²⁾ < 0,001*
Mais de um ano	9	28,1	-	-	
Não fumante	22	68,8	35	100,0	

(*) : Diferença significativa ao nível de 5,0%; (1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.; (2): Através do teste Exato de Fisher. Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e mediana das variáveis: idade do paciente, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica segundo o grupo

Variável	Grupo		Valor de p
	Teste	Controle	
	Média ± DP (Mediana) (1)	Média ± DP (Mediana)	
• Idade (anos)	49,34 ± 4,94 (50,00)	28,29 ± 10,99 (23,00)	p ⁽²⁾ < 0,001*
• Profundidade de sondagem	6,09 ± 1,96 (5,25)	2,47 ± 0,55 (2,50)	p ⁽²⁾ < 0,001*
• Sangramento à sondagem	38,23 ± 13,27 (34,67)	12,38 ± 3,43 (11,06)	p ⁽²⁾ < 0,001*
• NIC	2,97 ± 0,69 (2,87)	0,71 ± 0,26 (0,69)	p ⁽²⁾ < 0,001*

(*): Diferença significativa a 5,0%; (1): DP significa desvio padrão; (2): Através do teste t-Student com variâncias desiguais. Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Pearson entre a idade e os parâmetros clínicos profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica por grupo.

Variável	Grupo	
	Teste	Controle
	r (p)	r (p)
• Profundidade de sondagem	0,363 (0,041*)	0,052 (0,767)
• Sangramento à sondagem	0,314 (0,080)	0,487 (0,003*)
• NIC	0,477 (0,006*)	-0,172 (0,323)

(*): Estatisticamente diferente de zero a 5,0%; Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 5 – Avaliação dos genótipos segundo a região polimórfica

Variável	Grupo				Valor de p
	Teste		Controle		
	n	%	N	%	
TOTAL	32	100,0	35	100.0	
• Genótipo: A163G					
AA	20	62,5	22	62,9	p ⁽¹⁾ = 0,976
AG	12	37,5	13	37,1	
GG	-	-	-	-	
• Genótipo: T245G					
TT	19	59,4	22	62,9	p ⁽²⁾ = 0,850
TG	12	37,5	11	31,4	
GG	1	3,1	2	5,7	
• Genótipo: T950C					
TT	10	31,2	11	31,4	p ⁽²⁾ = 1,000
TC	15	46,9	17	48,6	
CC	7	21,9	7	20,0	

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson; (2): Através do teste Exato de Fisher; Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 6 – Frequência dos alelos do gene da osteoprotegerina a região polimórfica

Variável	Grupo				Valor de p
	Teste		Controle		
	n	%	n	%	
TOTAL	64	100,0	70	100.0	
• Genótipo: A163G					
A	52	81,2	57	81,4	p ⁽¹⁾ = 0,979
G	12	18,8	13	18,6	
• Genótipo: T245G					
T	48	75,0	55	78,6	p ⁽¹⁾ = 0,624
G	16	25,0	15	21,4	
• Genótipo: T950C					
T	35	54,7	39	55,7	p ⁽¹⁾ = 0,905
C	29	45,3	31	44,3	

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson; Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 7 – Média e desvio padrão da profundidade de sondagem segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo

Genótipos	Grupo	
	Teste	Controle
	Média ± DP ⁽¹⁾	Média ± DP
• A163G		
AA	6,10 ± 1,96	2,48 ± 0,50
AG	6,08 ± 2,05	2,46 ± 0,66
Valor de p	p⁽²⁾ = 0,982	p⁽²⁾ = 0,937
• T245G		
TT	5,80 ± 1,77	2,68 ± 0,45 ^(A)
TG	5,96 ± 1,92	2,18 ± 0,56 ^(A)
GG	9,50 ± 0,71	1,75 ± 0,35 ^(B)
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,123	p⁽³⁾ = 0,010*
• T950C		
TT	6,75 ± 2,25	2,09 ± 0,58 ^(A)
TC	5,97 ± 2,08	2,62 ± 0,45 ^(B)
CC	5,43 ± 0,93	2,71 ± 0,49 ^(B)
Valor de p	p⁽⁴⁾ = 0,382	p⁽⁴⁾ = 0,017*

(*): Diferença significativa a 5,0%; (1): DP significa desvio padrão.; (2): Através do teste t-Student com variâncias iguais; (3): Através do teste de Kruskal-Wallis com comparações do referido teste; (4): Através do teste F (ANOVA) com comparações de Tukey. Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 8 – Média e desvio padrão do percentual de sangramento à sondagem segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo

Genótipos	Grupo	
	Teste	Controle
	Média ± DP ⁽¹⁾	Média ± DP
• A163G		
AA	39,48 ± 12,73	12,93 ± 3,71
AG	36,15 ± 14,44	11,43 ± 2,78
Valor de p	p⁽²⁾ = 0,502	p⁽²⁾ = 0,216
• T245G		
TT	36,84 ± 13,15	11,61 ± 2,59
TG	36,52 ± 11,31	14,26 ± 4,47
GG	60,99 ± 1,75	10,44 ± 0,88
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,101	p⁽³⁾ = 0,182
• T950C		
TT	39,95 ± 13,02	11,58 ± 2,88
TC	40,89 ± 14,14	12,31 ± 3,40
CC	30,06 ± 9,39	13,77 ± 4,32
Valor de p	p⁽⁴⁾ = 0,183	p⁽⁴⁾ = 0,432

(*): Diferença significativa a 5,0%; (1): DP significa desvio padrão; (2): Através do teste t-Student com variâncias desiguais; (3): Através do teste de Kruskal-Wallis; (4): Através do teste F (ANOVA). Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

Tabela 9 – Média e desvio padrão do nível de inserção clínica segundo a ocorrência na região polimórfica pesquisados por grupo

Genótipos	Grupo	
	Teste	Controle
	Média ± DP ⁽¹⁾	Média ± DP
• A163G		
AA	2,97 ± 0,68	0,70 ± 0,26
AG	2,98 ± 0,72	0,71 ± 0,25
Valor de p	p⁽²⁾ = 0,955	p⁽²⁾ = 0,930
• T245G		
TT	2,88 ± 0,62	0,62 ± 0,24 ^(A)
TG	2,94 ± 0,71	0,83 ± 0,22 ^(B)
GG	4,05 ± 0,23	1,00 ± 0,18 ^(B)
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,148	p⁽³⁾ = 0,024*
• T950C		
TT	3,17 ± 0,78	0,85 ± 0,25
TC	2,93 ± 0,73	0,64 ± 0,24
CC	2,78 ± 0,39	0,63 ± 0,22
Valor de p	p⁽⁴⁾ = 0,499	p⁽⁴⁾ = 0,058

(*) Diferença significativa a 5,0%; Fonte: pacientes atendidos no Centro Médico Ermírio de Moraes e na Clínica de Estomatologia da UFPE.

APÊNDICE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO DE ODONTOLOGIA

FICHA CLÍNICA

APÊNDICE A

IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: _____
2. Nacionalidade: _____ Sexo: _____ Idade: _____
3. Estado civil: _____ Fone: _____ cel: _____
4. Renda (salários): _____ Tipo de diabetes: _____
5. Tempo do tratamento do diabetes: _____
6. Uso de insulina: _____ Hábito de fumar: _____
7. Escolaridade:
 - I. () Não sabe ler ou escrever
 - II. () 1º grau incompleto
 - III. () 1º grau completo
 - IV. () 2º grau incompleto
 - V. () 2º grau completo
 - VI. () Universidade incompleta
 - VII. () Universidade completa
 - VIII. () Pós-graduação
 - IX. () Não sei

PERIOGRAMA

FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____
DATA: _____

Dente	Sondagem (mm)						Recessão Gengival (mm)						Furca			Mob
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina						
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	D	P	
18																
17																
16																
15																
14																
13																
12																
11																
21																
22																

NOME DA PESQUISA: Análise do polimorfismo do gene da osteoprotegerina (OPG) em pacientes diabéticos tipo II e sua associação à condição periodontal.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Keila Cristina Raposo Lucena (Mestranda em Clínica Integrada UFPE). Endereço: R. Vitoriano Palhares – 250/Torre. Telefone para contato: 3228-3475 ou 9418-3970. Endereço Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária. CEP: 50670-901, Recife – PE. Telefone: 2126-8588.

OBJETIVO: Analisar a distribuição das formas existentes dos genes da proteína osteoprotegerina - OPG em pacientes diabéticos tipo II atendidos no setor de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e relacioná-los com a severidade da doença periodontal.

METODOLOGIA: Serão avaliados o sangramento gengival, profundidade de bolsa periodontal e perda de inserção através de um exame clínico periodontal. A análise do polimorfismo do gene da OPG será realizada mediante a coleta de sangue nos pacientes diabéticos no Hospital das Clínicas da UFPE. Para a coleta do sangue, não será necessária uma nova intervenção médica uma vez que, será utilizada nesta pesquisa, uma pequena parte do sangue já coletado durante os exames de rotina.

BENEFÍCIO: Os participantes desta pesquisa receberão orientações para prevenção e tratamento da doença periodontal bem como, uma vez diagnosticados, serão encaminhados para o Curso de Especialização em Periodontia da UFPE para a realização do referido tratamento.

RISCO: Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de, durante o exame clínico, haver constrangimento, sangramento gengival e, na coleta do sangue, o risco de hematoma e desconforto.

Eu, _____, RG.Nº. _____

Abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo participar desta pesquisa, para o trabalho de mestrado realizado no Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, bem como autorizo toda a documentação necessárias, a divulgação e a publicação da mesma, em periódicos científicos, na área de Odontologia.

DIREITOS:

1. A garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso me traga prejuízo;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito por parte da instrução à saúde, em casos de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
5. O compromisso de proporcionar-me informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar a minha vontade de continuar participando;
6. Caso existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tendo ciência do exposto acima, desejo participar da pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

Assinatura da Testemunha

ANEXO

1 SCOPE AND POLICY

The Journal of Applied Oral Science is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental community, following the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations, as well as invited case reports and invited reviews in the field of Dentistry and related sciences.

2 GENERAL GUIDELINES

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.5 The date of receipt of the original paper will be indicated in the occasion it is published.

2.6 Each author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

2.7 Depending on the financial resources of the Journal of Applied Oral Science or the authors, color illustrations will be published at the discretion of the Editor-in-Chief.

3 REVISION CRITERIA

3.1 Manuscripts will be firstly evaluated regarding presentation according to the instructions for authors. Manuscripts not in accordance with instructions will be returned to authors without being reviewed by referees.

3.2 Manuscripts in accordance with the instructions will be appreciated in their scientific merit and methods by at least two referees from different institutions of that of the authors, besides the Editor-in-Chief. When revision of the original is required, the manuscript will be returned to the corresponding author for modification. A revised version with modifications will be re-submitted by the authors, and that will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

3.3 The Editor-in-Chief will decide upon the acceptance of the manuscript, and may return it to the authors for revision and necessary modifications in the text or illustrations. In this case, the authors will be required to re-submit a revised version with the modifications or proper explanations. The revised version will be appreciated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

3.4 Upon approval of the scientific merit, manuscripts will be analyzed regarding the use of proper English grammar (technical review) and statistics. If manuscripts are still considered inadequate, they will be returned to authors for revision.

3.5 Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

3.6 Contents of the manuscript are authors' responsibility and do not reflect the opinion of the

Editor-in-Chief or Editorial Board.

4 GALLEY PROOF

4.1 Galleys will be sent to the corresponding author by electronic mail in pdf format for final approval.

4.2 Approval of galleys by the corresponding author should be returned with corrections, if necessary, within 72 hours.

4.3 If not returned within 72 hours, the Editor-in-Chief will consider the present version the final, and will not allow further modifications. Corrections in the galleys should be restricted to minor mistakes that do not modify the content of the manuscript. Major corrections will imply that the manuscript should enter the review process again.

4.4 Inclusion of new authors is not allowed at this phase of the publication process.

5 SUBMISSION OF THE MANUSCRIPT

5.1 Articles must be submitted at the following address:

<http://submission.scielo.br/index.php/jaos>

5.2 Author should retain the original file in Word format as well as illustrations (when applicable).

5.3 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page should be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

5.4 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 6.1.

5.5 Tables must be prepared in Excel format and must be submitted as a supplementary files.

5.6 **Submission Form, signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file** containing the following text:

By signing the Submission Form, the authors state:

Copyright transfer: In the event of publication of the above mentioned manuscript, we, the authors, transfer to the Journal of Applied Oral Science, all rights and interest of the manuscript. This document applies to translations and any preliminary presentation of the contents of the manuscript that has been accepted, but yet not published. If any authorship modification occurs after submission, a document of agreement of all authors is required to be kept on the journal files. Exclusion of authors may only be accepted by his/her own request.

Responsibilities of the authors: I hereby state that:

The content is original and does not consist of plagiarism or fraud;

The work is not under consideration or will be submitted to other journal until a final decision is issued by this journal;

I have effectively contributed to this work and am familiar with its contents;

I have read it and assume the responsibility for its contents. I understand that if the work, or part of it, is considered deficient or a fraud, I take shared responsibility with the other authors.

Release of conflict of interest:

All my affiliations, corporate or institutional, and all sources of financial support to this research are properly acknowledged, except when mentioned in a separate letter. I certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.

PRINT NAME: _____ SIGNATURE: _____ DATE: _____

5.8 Presentation of the Manuscript

5.8.1 Structure of the manuscript

- Cover page (must be submitted as a supplementary file):

The first page should contain only:

- Title of the manuscript in English.
- Names of the authors with their respective degrees and affiliations in English: Correspondence between International and Brazilian degrees may be obtained from our web page:

www.fob.usp.br/jaos.

- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

5.8.2 Text

- Title of the manuscript and subtitle, if necessary.
- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting the objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br> . Authors must use "periods" to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the materials and methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed if applicable. Please refer to item 7 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text and just important findings should be highlighted.
- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Only findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings, as well as their limitations.
- Conclusion(s) (if any)
- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective identification numbers.
- References (please refer to item 6.3)

6 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

6.1 Illustrations and Tables

6.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numerals according to the order they appear on the text.

6.1.2 Photographs should be sent in original color and digitized in .jpg, tif or gif formats with 10cm width and at least 300dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not

inserted in the Word document.

6.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a list preceded by the corresponding number.

6.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numerals. The legend shall be placed on their top. Tables should be open in the right and left laterals.

6.1.5 Footnotes should be indicated by an asterisk and restricted to the least amount possible.

6.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: ... and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10}, or

2) alphanumeric

- one author - Silva²³ (1986)

- two authors - Silva and Carvalho²⁵ (1987)

- three authors - Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1987)

- more than three authors - Silva, et al.²⁸ (1988)

Punctuation characters such as "periods" and "commas" must be placed after the numeric citation of the authors. Ex. Ferreira³⁸.

6.3 References

The references must follow the Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver, at the URL: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

6.3.1 All references should be cited in the text. They should be **ALPHABETICALLY ORDERED** by the surname of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

6.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date should not be included in the reference list.

6.3.3 The use of abstracts, monographs, dissertations and theses as references is not accepted.

6.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Uhl, et al.

6.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews where more references are allowed.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Wolters JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton: CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al.".

Parkin DM, Clayton D, Black, RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. Science. 1993;260:428-9.

Volume with supplement and/or Special Number

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

7 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS**7.1 Experimental procedures in humans and animals**

The journal reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval. The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

7.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

In order to register a clinical trial, please access one the following addresses:

Register in the **Clinicaltrials.gov**

URL: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>

Register in the **International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)**

URL: <http://www.controlled-trials.com/>

8 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE EDITORIAL BOARD AND EDITOR-IN-CHIEF

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Manuscripts must have at most 15 pages, including figures, tables and references. Dissertations , theses and abstracts are not accepted as references.
2. The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 paper.
3. Photographs must be sent in original color and digitized in jpg , tif or gif formats with at least 300dpi. These illustrations must be provided in separate files and not inserted in the Word document. The tables must be sent in Excel document (xls files).
4. Names of the authors (first, middle and last names) with their respective degrees.
5. Structured abstract in English(Objectives, Material and Methods, Results and Conclusions).
6. Uniterms (key words in English).
7. The text must be divided into the following chapters: 1- Introduction; 2 – Literature Review (only for invited reviews, when necessary); 3 – Material and Methods; 4 - Results; 5 - Discussion; 6 - Conclusions.
8. All the references cited within the text must be present in the reference list at the end of the manuscript.
9. The corresponding legends should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a list, preceded by the corresponding number.
10. The references must follow the Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver. Please, refer to the examples given in the Instructions for Authors.
11. Full mail and e-mail addresses of the corresponding author must appear on the cover page.

Declaração de Direito Autoral

The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

Política de Privacidade

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Dear Contributors,

As we did in previous occasions, due to the holiday season and vacation time, we are temporarily blocking our online system for new submissions. Additionally, our Dean has recently appointed the Associate Editors of the JAOS, who now need to get used to the online system and the reviewing process in order to manage the substantial number of submissions we have received in the last months.

As far as those submissions currently under review, it will be possible to normally upload revised texts and letters with detailed responses to the reviewers. We repeat that the system is only blocked for new submissions! We count on everyone's comprehension and support .

We take advantage of this opportunity to wish a Merry Christmas and a Happy New Year to all.

Warm regards,

Carlos F. Santos

Editor-in-Chief

Journal of Applied Oral Science

©2010

Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
Serviço de Biblioteca e Documentação FOB-USP
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla 9-75
17012-901 Bauru SP Brasil
Tel.: (14) 3235-8373

Warning for international contributors:

The Journal of Applied Oral Science kindly asks the **non-Brazilian contributors** who are interested in having any kind of information regarding their submissions to directly contact Dr. Carlos F. Santos, the Editor-in-Chief, through the journal's e-mail address (jaos@usp.br) or phone (+55 14 91131833).



jaos@usp.br

Análise do polimorfismo da osteoprotegerina (OPG) em pacientes diabéticos associados à periodontite

Analysis of associations between osteoprotegerin polymorphisms and periodontitis in patients with diabetes

Keila Cristina Raposo LUCENA¹; Renata Cimões Jovino SILVEIRA²; Paulo Roberto Eleutério de SOUZA³; Mariana Perez CORRÊA⁴ Jair Carneiro LEÃO⁵; Alessandra de Albuquerque Tavares CARVALHO⁶

¹ Doctorate's Student in Integrated Clinical Dentistry; REUNI program grant holder, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

² Adjunct professor; Permanent member of Postgraduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

³ Adjunct professor II; Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴ Graduate's Student of dentistry; Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁵ PhD; Adjunct professor II; Permanent member of Postgraduate Program in Dentistry; Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁶ Adjunct professor; Permanent member of Postgraduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Address for correspondence:

Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Av. Professor Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil

CEP: 50670-901. Email: at.carvalho@uol.com.br

RESUMO

OBJETIVO: Este estudo analisou a presença de polimorfismos na região promotora -163A/G, -245T/G e -950T/C do gene da osteoprotegerina (OPG), bem como a sua distribuição e associação em pacientes diabéticos e com periodontite quando comparados ao grupo controle saudável. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A pesquisa contou com a participação de 67 indivíduos distribuídos em um grupo teste (n=32), constituído por pacientes diabéticos e com periodontite, e outro controle (n=35) que incluíam pacientes não diabéticos e sem periodontite. Foram incluídos indivíduos entre 21 e 55 anos de idade com, no mínimo, 15 dentes presentes, que não faziam uso de medicação, exceto para a diabetes, e que não apresentavam outra doença sistêmica. Para o diagnóstico da periodontite, foram avaliados os parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, sendo sondados seis sítios em cada dente presente e diagnosticada a periodontite na presença de dois ou mais sítios com profundidade de sondagem e nível de inserção clínica ≥ 4 mm. O DNA para a investigação dos polimorfismos da OPG, através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, foi obtido a partir do soro sanguíneo dos participantes. **RESULTADOS:** Não foi observada associação entre polimorfismos da região promotora do gene da OPG em pacientes com periodontite e diabetes mellitus ($p>0,005$). O alelo mais freqüente no grupo teste foi o A163(81,2%), seguido pelo T245(75,0%) e pelo T950(54,7%). O alelo T950, possível marcador da osteoclastogênese, não foi associado à condição periodontal dos pacientes diabéticos ($p>0,005$). **CONCLUSÃO:** Não foi encontrada associação entre polimorfismos genéticos da OPG em pacientes diabéticos e com periodontite.

Palavras-chave: diabetes, periodontite, osteoprotegerina, polimorfismo.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of the present study was to analyze polymorphisms in the promoter region (-163A/G, -245T/G and -950T/C) of the gene osteoprotegerin (OPG) as well as the distribution and association of these polymorphisms in patients with diabetes and periodontitis in comparison to a health control group. **MATERIALS AND METHODS:** The study involved the participation of sixty-seven individuals – 32 in the test group (diabetic patients with periodontitis) and 35 in the control group (non-diabetic individuals without periodontitis). Individuals 21 and 55 years of age with at least 15 teeth who made no use of medication other than for diabetes and had no other systemic disease were included in the study. The following clinical parameters were assessed for the diagnosis of periodontitis: pocket depth, bleeding upon probing and attachment loss. Six sites on each tooth were probed. Periodontitis was diagnosed when two or more sites had a pocket depth and attachment loss ≥ 4 mm. DNA was obtained from the blood serum of the participants for the investigation of OPG polymorphisms using the conventional polymerase chain reaction method. **RESULTS:** No association was found between periodontitis and polymorphisms in the promoter region of the OPG gene in patients with diabetes ($p>0.005$). The most frequent allele in the test group was A163 (81.2%), followed by T245 (75.0%) and T950 (54.7%). The T950 allele, which is a possible marker of osteoclastogenesis, was not associated with periodontal status in patients with diabetes ($p>0.005$). **CONCLUSION:** No association was found between periodontitis and genetic polymorphisms in the OPG gene in patients with diabetes.

Keywords: diabetes, periodontitis, osteoprotegerin, polymorphisms

1 INTRODUCTION

Evidence suggests that diabetes mellitus affects periodontal tissue by reducing leukocyte functions, such as chemotaxis, adherence and phagocytosis. Diabetes is also considered a risk factor for periodontal disease, considering the incidence, progression and severity of this condition in diabetic individuals ^[1-3].

According to Andersen et al.,^[4] a number of mechanisms may explain the increased susceptibility to periodontitis among individuals with diabetes, in whom sustained hyperglycemia exerts an indirect influence on the cellular level through the production of advanced glycation end products and may also directly affect the cells involved in periodontal homeostasis. Among such cellular alterations, the increased production of matrix metalloproteinases, reduction in collagen synthesis, reduction in growth factors and deregulation of the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as well as the balance between mediators of bone metabolism, such as receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK), its ligand RANKL and osteoprotegerin (OPG), may predispose individuals with diabetes to a greater incidence and progression of periodontal disease. Indeed, periodontitis is considered the sixth most common complication of diabetes mellitus, according to the American Academy of Diabetes ^[2,4].

Alveolar bone loss, which is mediated by the immune response of the host to the buildup of bacterial plaque, is one of the main indicators of periodontitis^[5]. The assessment of clinical attachment loss and periodontal

pockets is often used for the diagnosis of this condition^[6,7]. However, new diagnostic modalities for the assessment of the onset and progression of periodontitis are also being employed, such as concentrations of RANK, RANKL and OPG^[6-8]. OPG, which is also known as osteoclastogenesis inhibition factor, is a bone-regulating protein made up of five exons and has the capacity to inhibit bone resorption. This protein interacts with RANKL, blocking its bonding to RANK, which are proteins responsible for the differentiation and activation of osteoclasts^[5,9,10].

Impairment to bone formation/repair is an important sign of periodontal disease. Under physiological conditions, there is a balance between bone resorption and formation. This balance maintains bone integrity and the metabolism of calcium and is mediated by the RANK/RANKL/OPG system.¹¹ In certain inflammatory conditions, such as periodontitis, this system is disturbed, causing a reduction in OPG level and an increase in the concentration of RANKL and resulting in pathologic bone resorption^[11,12].

Differences in the proportions of RANKL/OPG may be related to the severity of periodontal disease^[1,6,8,13]. The importance of the regulation of these proteins in bone destruction has been demonstrated in a number of studies, which state that an increase in RANKL concentration and reduction in OPG concentration may indicate periodontitis^[13-15]. Studies report high concentrations of OPG in the plasma and saliva of patients with diabetes, while these concentrations are reduced in individuals with both diabetes and periodontitis^[1,6,8].

Given the importance of the RANK/RANKL/OPG system in the pathogenesis of periodontal disease and its influence on diabetes, the notion that genetic polymorphisms in the OPG gene are related to an increased susceptibility to periodontitis in diabetic patients has been questioned. Langdahl et al ^[16] identified 12 different polymorphisms in the OPG gene, including the promoter region corresponding to positions -163A/G, -245T/G and -950T/C. The identification of these polymorphisms is reported to be a valuable diagnostic tool for assessing the risk of periodontitis ^[17]. Moreover, studies have identified polymorphisms in the OPG gene associated with cardiovascular disease,^[20] bone fractures ^[8] and osteoporosis ^[21] in different populations. However, a number of studies have found no correlation between such polymorphisms and chronic or aggressive periodontitis^[10,17-20].

While the literature has demonstrated the effect of the biological activity of a variety of cytokines, such as OPG, on the destruction of the periodontium in individuals with diabetes, the mechanisms involved in this process have not been fully clarified. Thus, the aim of the present study was to analyze genetic polymorphisms in the OPG gene in individuals with both diabetes and periodontitis.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample

An experimental trial was carried out involving a convenience sample made up of 67 participants: 32 individuals with a diagnosis of type 2 diabetes for at least five years and periodontitis (test group) and 35 non-diabetic individuals without periodontitis (control group). The participants were examined at the

Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of the *Universidade Federal de Pernambuco* in the city of Recife, Brazil. This study received approval from the Human Research Ethics Committee of the university (process number: 088/09).

The inclusion criteria were age between 21 and 55 years, either gender and having a minimum of 15 teeth, based on studies carried out by Costa et al.^[6] and Lappin et al.^[8]. The following were the exclusion criteria: smoking habits; pregnancy or lactation; use of antibiotics; having undergone periodontal treatment in the previous six months; medical treatment for systemic conditions other than diabetes; major complication of diabetes (retinopathy, neuropathy, nephropathy and atherosclerosis); and menopause.

2.2 Clinical parameters

The periodontal exam involved the assessment of pocket depth, bleeding upon probing and attachment loss. Six sites on each tooth were examined using a William periodontal probe (Trinity®). Peridontitis was defined as pocket depth and attachment loss ≥ 04 mm in two or more sites^[8] based on the criteria established by the American Academy of Periodontology.

2.3 Polymerase chain reaction

DNA was extracted from blood samples using the DNA blood mini kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The following primers and annealing temperatures were used: F- AACTTGAACACTTGGCCCTGA and R- AAATTGGACTGCCTGGGG at 60° C for -163A/G and -245T/G; and F- GTTCCTCAGCCCGGTGGCTTTT and R- TGTGGTCCCCGGAACTTCAGG at 64° C for -950T/C.

Genotypes from the promoter region of the OPG gene were amplified using the conventional polymerase chain reaction (PCR) method in a total volume of 25 μ L, containing 12.5 μ L of Top Taq Polymerase (Qiagen), 0.6 μ L of each primer and 4 μ L of DNA. The amplifications were performed with 35 cycles of denaturation at 96° C for 45 s, annealing temperatures for each primer (described above) for 45 s, extension at 72° C for 45 s, with initial denaturation at 96° C for 5 min and final extension at 72° C for 10 min, following the procedures described by Park et al. ^[17].

The restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) was used to detect the length of the amplified fragments following digestion by the restriction enzyme. This method involves a transition base for the A163G genotype (A/G); the T245G genotype (T/G) and T950C genotype (T/C) of the OPG gene, establishing a specific restriction site for each enzyme. RFLP was performed in a total volume of 20 μ L, using 1 U of each restriction enzyme (*HinfI*, *VspI* and *HincII*) (Promega) and 8 μ L of the PCR product, digested at 37° C for 2 h. The digested products were separated in 3% agarose gel.

2.4 Statistical analysis

The frequency of the genotypes and alleles in the test and control groups was analyzed using Pearson's chi-square test (χ^2) and Fisher's exact test. The Kruskal-Wallis test and F test (ANOVA) with Tukey comparisons were used to determine associations between genotypes and clinical parameters. Results achieving a p-value < 0.05 were considered significant. The statistical calculations were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 15).

3 RESULTS

Table 1 displays the clinical parameters (pocket depth, bleeding upon probing and attachment loss) and age of the participants in both groups. The mean values of each variable were significantly higher in the test group than the control group ($p < 0.001$).

The PCR analysis revealed mutations in the -245T/G and -950T/C regions. These mutations were represented by two bands in the respective genotypes, characterizing a (GG)T245G and (CC)T950C homozygous carrier. However, no statistically significant differences between groups were detected with regard to these mutations ($p > 0.05$). The greatest variation occurred in the T245G genotype ($p = 0.850$) (Table 2). Likewise, no statistically significant association was found between periodontal disease and diabetes with regard to the distribution of alleles (Table 3).

The clinical parameters were analyzed in relation to the polymorphic regions in order to determine possible associations between the severity of periodontal disease and polymorphisms in the OPG gene in patients with type 2 diabetes. In the control group, mean pocket depth was lesser in the GG genotype (mutant) and greater in the TT genotype (wild) of the -245T/G region, whereas mean pocket depth was lesser in the TT genotype (wild) and greater in the occurrence of the TC or CC genotype (mutant) of the -950T/C region (Table 4). Bleeding upon probing was not influenced by the genotype profile of OPG in either the test group or control group (Table 5). With regard to attachment loss, a significant result was only found in the -245T/G region in the control group, for which the GG mutant genotype achieved the highest mean value (Table 6).

4 DISCUSSION

The present study found no significant association between polymorphisms in the promoter region of the OPG gene and chronic periodontitis in patients with diabetes. Despite the high prevalence and incidence of periodontal disease in patients with diabetes, few studies have been conducted for the identification of genetic markers for these conditions. Lappin et al.^[8] found that patients with diabetes may have difficulties with regard to bone remodeling, suggesting that bone formation defects could influence the progression of periodontitis in these individuals. Studying the modulating role of diabetes in individuals with chronic periodontitis, Duarte et al.^[1] suggest that the disease may exert such an effect through the inhibition of OPG production, thereby favoring the bone resorption process over bone formation. However, experiments carried out by Costa et al.^[6] suggest that patients with both diabetes and periodontal disease have high salivary concentrations of OPG, which may be related to the vascular involvement that commonly stems from diabetes. Thus, high concentrations of OPG may represent a defense mechanism against arterial calcification and other forms of vascular impairment.

There are few studies that associate polymorphisms in the promoter region of the OPG gene with periodontitis. The results of the present study corroborate findings described by Baioni et al.^[18] and Park et al.,^[17] who found no association between the -950T/C region and periodontitis. Baioni et al.^[18] also assessed this region in patients with both periodontitis and chronic kidney disease and found no association. Likewise, Wagner et al.^[10] found no association between the -950T/C region and periodontitis; however, the authors

studied polymorphisms in the exons of the OPG gene, whereas the present study focused on the promoter region of the gene.

The results of the present study corroborate findings described by Park et al.^[17] and Wohlfahrt et al.,^[20] who found no association between periodontitis and polymorphisms in the -245T/G promoter region. In the present study, the individuals in the control group exhibited mutations in this region (GG). When associated with pocket depth and clinical attachment loss, such mutations proved significant, as a lesser mean pocket depth ($p = 0.010$) and greater attachment loss ($p = 0.024$) were found in the mutant group (GG) of the polymorphic region. However, these associations may have occurred due to the small number of individuals who displayed such mutations, thereby reflecting statistical variation.

While there is no consensus in the literature, a number of studies suggest an association between the T950 allele and an increase in osteoclast activity. Park et al.^[17] report a greater prevalence of this allele in patients with periodontitis. However, the authors studied genetically homozygous Korean subjects, in contrast to the present sample, which was genetically heterozygous. Baioni et al.^[18] analyzed a genetically heterozygous population and found no association between the T950 allele and chronic periodontitis, which is in agreement with the findings of the present study.

Associations between OPG polymorphisms and other systemic diseases have often been studied, such as osteoporosis, kidney disease, vascular disease and menopause. Ohmori et al.^[22] and Vidal et al.^[23] studied the association between the T950 allele and osteoporosis. Baioni et al.^[18] studied

the association between polymorphisms in the -950T/C region and chronic kidney disease. Brandstrom et al.^[24] and Solfi et al.^[25] report an association between the C950 allele and cardiovascular disease. The latter association should be investigated further, as periodontitis may also be considered an important risk factor for cardiovascular disease, which is also associated with diabetes.

Based on the results of the present study, no association was found between periodontitis and polymorphisms in the OPG gene in patients with diabetes. However, further studies should be carried out in order to clarify the role of OPG and other mediators of bone metabolism in the pathogenesis of periodontitis, considering the high incidence, progression and severity of this disease in patients with diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received support from the Brazilian fostering agency *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* and the REUNI program.

REFERENCES

- 1- Duarte PM, Neto JBG, Casati MZ, Sallum EA et al. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. **Oral Diseases** 2007; 13:594-599.
- 2- Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic American with type 2 diabetes. **J Periodontol** 2008; 79:629-636.
- 3- Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and Peri-implant conditions: update on associations and risks. **J Clin Periodontol** 2008; 35 Suppl 8: 398-409.
- 4- Andersen CCP, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodents studies. **J Periodontol** 2007; 78(7):1264-1275.
- 5- Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol** 2005; 76:2033-2041.
- 6- Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8 and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. **J Periodontol** 2010; 81(3):384-391.
- 7- Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV et al. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. **J Periodontol** 2008; 79:1913-1919.
- 8- Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, et al. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. **J Clin Periodontol** 2009; 36:634-641.

- 9- Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy** 2007; 9 Suppl 1:1-7.
- 10- Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol** 2007; 34:823-827.
- 11- Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol** 2008; 79 suppl 8:1569-1576.
- 12- Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **J Clin Periodontol** 2007; 34:367-369.
- 13- Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **J Dent Res** 2004; 83(2):166-9.
- 14- Belibasakis NG, Bostanci N, Hashim A, Johansson A et al. Regulation of RANKL and OPG gene expression: in human gingival fibroblast and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. **Microbiol Pathogenesis** 2007; 43:46-53.
- 15- Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive therapy periodontitis patients. **J Clin Periodontol** 2007; 34:271-277.
- 16- Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Crixsen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. **J Bone Miner Res** 2002; 17:1245-1255.

- 17- Park O-J, Shin S-Y, Choi Y, Kim M-H. et al. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. **Oral Diseases** 2008; 14: 440-444.
- 18- Baioni CS, Souza CM, Ribeiro APB, Luczyszyn SM et al. Analysis of the association of polymorphism in the osteoprotegerin gene with susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. **J Periodont Res** 2008; 43:578-84.
- 19- Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. **J Periodontol Res** 2006; 41:397-404.
- 20- Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, et al. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. **J Periodontol** 2006; 77:426-436.
- 21- O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C, Devlin N, et al. Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** 2010; 26:496-502.
- 22- Ohmori H, Makita Y, Funamizu M. Linkage association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. **J Hum Genet** 2002; 47:400-406.
- 23- Vidal C, Brincat M, Xuereb AA. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. **Maturitas** 2006; 53:386-395.
- 24- Brandstrom H, Stiger F, Lind L, Kahan T, et al. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is

related to vascular morphology and function. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 293:13-17.

25- Solfi M, Schoppet M, Sattler AM et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:3764-3768.

TABLES

Table 1 – Patient age, pocket depth, bleeding upon probing and attachment loss in test and control groups

Variable	Group		p-value
	Test	Control	
	Mean $\pm$ SD (Median) (1)	Mean $\pm$ SD (Median)	
• Age (years)	49.34 $\pm$ 4.94 (50.00)	28.29 $\pm$ 10.99 (23.00)	p ⁽²⁾ < 0.001*
• Pocket depth	6.09 $\pm$ 1.96 (5.25)	2.47 $\pm$ 0.55 (2.50)	p ⁽²⁾ < 0.001*
• Bleeding upon probing	38.23 $\pm$ 13.27 (34.67)	12.38 $\pm$ 3.43 (11.06)	p ⁽²⁾ < 0.001*
• Attachment loss	2.97 $\pm$ 0.69 (2.87)	0.71 $\pm$ 0.26 (0.69)	p ⁽²⁾ < 0.001*

(*): Significant difference to 5.0%; (1): SD – standard deviation; (2): Student's t-test with unequal variances;

Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil

Table 2 – Occurrence of genotypes according to polymorphic region

Variable	Group				p-value
	Test		Control		
	n	%	N	%	
TOTAL	32	100.0	35	100.0	
● Genotype: A163G					
AA	20	62.5	22	62.9	p ⁽¹⁾ = 0.976
AG	12	37.5	13	37.1	
GG	-	-	-	-	
● Genotype: T245G					
TT	19	59.4	22	62.9	p ⁽²⁾ = 0.850
TG	12	37.5	11	31.4	
GG	1	3.1	2	5.7	
● Genotype: T950C					
TT	10	31.2	11	31.4	p ⁽²⁾ = 1.000
TC	15	46.9	17	48.6	
CC	7	21.9	7	20.0	

(1): Pearson's chi-square test; (2): Fisher's exact test; Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil

Table 3 – Frequency of alleles of osteoprotegerin gene according to polymorphic region

Variable	Group				p-value
	Test		Control		
	n	%	n	%	
TOTAL	64	100.0	70	100.0	
• Genotype: A163G					
A	52	81.2	57	81.4	p ⁽¹⁾ = 0.979
G	12	18.8	13	18.6	
• Genotype: T245G					
T	48	75.0	55	78.6	p ⁽¹⁾ = 0.624
G	16	25.0	15	21.4	
• Genotype: T950C					
T	35	54.7	39	55.7	p ⁽¹⁾ = 0.905
C	29	45.3	31	44.3	

(1): Pearson's chi-square test; Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil

Table 4 – Pocket depth according to polymorphic region in test and control groups

Genotype	Group	
	Test	Control
	Mean $\pm$ SD ⁽¹⁾	Mean $\pm$ SD
• A163G		
AA	6.10 $\pm$ 1.96	2.48 $\pm$ 0.50
AG	6.08 $\pm$ 2.05	2.46 $\pm$ 0.66
p-value	p⁽²⁾ = 0.982	p⁽²⁾ = 0.937
• T245G		
TT	5.80 $\pm$ 1.77	2.68 $\pm$ 0.45 ^(A)
TG	5.96 $\pm$ 1.92	2.18 $\pm$ 0.56 ^(A)
GG	9.50 $\pm$ 0.71	1.75 $\pm$ 0.35 ^(B)
p-value	p⁽³⁾ = 0.123	p⁽³⁾ = 0.010*
• T950C		
TT	6.75 $\pm$ 2.25	2.09 $\pm$ 0.58 ^(A)
TC	5.97 $\pm$ 2.08	2.62 $\pm$ 0.45 ^(B)
CC	5.43 $\pm$ 0.93	2.71 $\pm$ 0.49 ^(B)
p-value	p⁽⁴⁾ = 0.382	p⁽⁴⁾ = 0.017*

(*): Significant difference to 5.0%; (1): SD – standard deviation; (2): Student's t-test with unequal variances; (3): Kruskal-Wallis test; (4): F test (ANOVA) with Tukey comparisons; Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil

Table 5 – Percentage of bleeding upon probing according to polymorphic region in test and control groups

Genotype	Group	
	Test	Control
	Mean $\pm$ SD ⁽¹⁾	Mean $\pm$ SP
• A163G		
AA	39.48 $\pm$ 12.73	12.93 $\pm$ 3.71
AG	36.15 $\pm$ 14.44	11.43 $\pm$ 2.78
p-value	p⁽²⁾ = 0.502	p⁽²⁾ = 0.216
• T245G		
TT	36.84 $\pm$ 13.15	11.61 $\pm$ 2.59
TG	36.52 $\pm$ 11.31	14.26 $\pm$ 4.47
GG	60.99 $\pm$ 1.75	10.44 $\pm$ 0.88
p-value	p⁽³⁾ = 0.101	p⁽³⁾ = 0.182
• T950C		
TT	39.95 $\pm$ 13.02	11.58 $\pm$ 2.88
TC	40.89 $\pm$ 14.14	12.31 $\pm$ 3.40
CC	30.06 $\pm$ 9.39	13.77 $\pm$ 4.32
p-value	p⁽⁴⁾ = 0.183	p⁽⁴⁾ = 0.432

(*): Significant difference to 5.0%; (1): SD – standard deviation; (2): Student's t-test with unequal variances; (3): Kruskal-Wallis test; (4): F test (ANOVA) with Tukey comparisons; Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil

Table 6 – Attachment loss according to polymorphic region in test and control groups

Genotype	Group	
	Test	Control
	Mean $\pm$ SD ⁽¹⁾	Mean $\pm$ SD
• A163G		
AA	2.97 $\pm$ 0.68	0.70 $\pm$ 0.26
AG	2.98 $\pm$ 0.72	0.71 $\pm$ 0.25
p-value	p⁽²⁾ = 0.955	p⁽²⁾ = 0.930
• T245G		
TT	2.88 $\pm$ 0.62	0.62 $\pm$ 0.24 ^(A)
TG	2.94 $\pm$ 0.71	0.83 $\pm$ 0.22 ^(B)
GG	4.05 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.18 ^(B)
p-value	p⁽³⁾ = 0.148	p⁽³⁾ = 0.024*
• T950C		
TT	3.17 $\pm$ 0.78	0.85 $\pm$ 0.25
TC	2.93 $\pm$ 0.73	0.64 $\pm$ 0.24
CC	2.78 $\pm$ 0.39	0.63 $\pm$ 0.22
p-value	p⁽⁴⁾ = 0.499	p⁽⁴⁾ = 0.058

(*): Significant difference to 5.0%; Source: patients treated at Ermírio de Moraes Medical Center and Stomatology Clinic of *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil