

CARLA SPAGLIARE BAIONI

**Análise da Associação entre um Polimorfismo no Gene
da Osteoprotegerina (OPG) e a Suscetibilidade à
Doença Renal Crônica e à Periodontite**

CURITIBA

2007

CARLA SPAGLIARE BAIONI

**Análise da Associação entre um Polimorfismo no gene da
Osteoprotegerina (OPG) e a suscetibilidade à Doença Renal
Crônica e à Periodontite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

CURITIBA

2007

DEDICO

Ao meu pai e minha mãe, Jaziel e Solange, pela presença constante, amor e dedicação. A educação que vocês me ensinaram e a proteção e cuidados que me transmitiram fizeram de mim uma pessoa segura e determinada. Os seus braços sempre abertos são uma fortaleza, que sempre me fizeram ver o mundo com olhos otimistas. Vocês são exemplo de vida e força.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Reitor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Prof. Dr. Ivo Clemente Juliatto; ao Decano do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Prof. Dr. Alberto Accioly Veiga e ao Diretor do Curso de Odontologia, Prof. Monir Tacla, pelo acolhimento nesta instituição de ensino superior.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Vieira, pela confiança, oportunidade e atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Westphalen pela coordenação da área de concentração em Estomatologia e pela atenção dispensada.

À orientadora Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto, pelo acompanhamento, dedicação, paciência, confiança, competência e ensinamentos prestados, tornando possível a realização deste trabalho para que eu chegasse até aqui.

Aos queridos amigos Prof^a. Dr^a. Marina de Oliveira Ribas e Prof. Dr. Wilson Denis Martins, por todo carinho, amizade, dedicação, respeito e empenho em ensinar a arte de lecionar e a arte de viver.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ignácio, pelo imenso auxílio, pela dedicação, competência, carinho, paciência e pelos ensinamentos da bioestatística.

Aos professores do Programa de Mestrado em Odontologia, que com muita dedicação nos transmitiram muitos ensinamentos, entre estes a importância da constante renovação de conhecimentos. Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, Prof^a. Dr^a. Luciana Reis de Azevedo, Prof^a. Dr^a. Maria Ângela Naval Machado, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Trindade Grégio, Prof. Dr. Julio Cezar Bisinelli, Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Sottile França, Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto, Prof. Dr. Samuel Jorge Moysés, Prof^a. Dr^a. Simone Tetu Moysés.

Aos queridos Prof. Santo Gentil Foroni e Prof. Wilson Kenji Shiroma, pela confiança depositada durante as cirurgias, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade conquistada.

Aos queridos amigos de turma Ana Cláudia, Roberta, Andressa, Thaís, Elcy, Therezinha, Fernando, Patrícia e Silvana, que contribuíram, cada um com suas qualidades em especial, para a realização deste curso. Muito obrigada pelo apoio, pelas palavras de carinho nos momentos difíceis.

À grande amiga Neide Borges, pela amizade, compreensão, dedicação e apoio. Muito obrigada! Sua presença foi fundamental para a realização deste mestrado.

Ao Doutorando em Ciências Biológicas e da Saúde, Cleber Machado de Souza, pelo empenho, dedicação, competência em me ajudar a desenvolver esta pesquisa, e pela amizade conquistada. Você sempre pode contar comigo!

A todos os pacientes e funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR e da Pró-Renal.

A todas as pessoas que, de qualquer maneira, contribuíram para a conclusão deste curso.

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Sumário

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM INGLÊS.....	10
2. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	35

Artigo em Inglês

Analysis of the Association of Polymorphism in the Osteoprotegerin (OPG) Gene with the Susceptibility to Chronic Kidney Disease and Periodontitis

Carla Spagliare Baioni*, Cleber Machado de Souza[†], Ana Paula Ribeiro Braosi[†], Sônia Mara Luczyszyn[†], Marco Antonio Dias da Silva[‡], Sergio Aparecido Ignácio[¶], José Rocha Faria-Neto[¶], Miguel Carlos Riella[§], Roberto Pecoits-Filho[¶], Paula Cristina Trevilatto[¶]

* Graduate student in Dentistry at Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brazil, 80215-901.

† Graduate student in Health Sciences at Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brazil, 80215-901.

‡ Professor at Faculty of Dentistry of Sao Jose dos Campos, State University of Sao Paulo (UNESP-SJC), Rua Eng. Francisco José Longo, 777, São José dos Campos, SP, Brazil, 12245-000.

¶ Professor at Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brazil, 80215-901.

§ Professor at Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brazil, 80215-901, and President of Renal, Diabetes and Hypertension Research Center of Pro-Renal Foundation (Pro-Renal), Rua Vicente Machado, 1290, Batel, Curitiba, PR, Brazil, 80440-020.

Corresponding author:

Paula Cristina Trevilatto, DDS, PhD

Center for Health and Biological Sciences (CCBS)

Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)

Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR

80215-901, Brazil

Phone/Fax: +55 (41) 3271-2618 / +55 (41) 3271-1657

e-mail: pctrev@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background/Aims: Chronic kidney disease (CKD) is a complex disorder, which may result in several complications involving disturbance of mineral metabolism, like extra-osseous calcification and bone diseases. Renal patients are also more prone to infections. Regarding complications of infectious nature, periodontitis (P) appear to be an important cause of persistent systemic inflammation in CKD patients, increasing morbidity in this population. Besides, P seems to be more prevalent and severe in CKD patients. Periodontitis is characterized by irreversible clinical attachment loss (CAL) caused by alveolar bone resorption around the teeth, which may lead to tooth loss. In this context, studies focusing mediators of bone metabolism might contribute to the understanding of mechanisms involved in CKD and P development. Osteoprotegerin (OPG) is a protein that antagonizes Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL), a key regulator of osteoclastogenesis. Polymorphisms are the main source of genetic variation and single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported as the major modulators of disease susceptibility. The aim of this study was to investigate the association between a polymorphism in the untranslated region (UTR) of the OPG gene and the susceptibility to CKD and P. **Material and Methods:** A sample of 224 subjects without and with CKD (in hemodialysis) was divided into groups with and without P. A polymorphism in the untranslated region (UTR) of OPG gene was analyzed by PCR-RFLP. The differences in observed frequencies of polymorphism among the groups were assessed by standard Chi-square and considered significant when p -value was ≤ 0.05 . **Results:** There was found no association between the study OPG polymorphism and susceptibility to CKD or P. **Conclusion:** The study polymorphism located at position -223 in the UTR region (also known as -950) was not associated with susceptibility to CKD or P. Other studies investigating other polymorphisms in this and other genes of the host response could help clarify the involvement of bone metabolism mediators in the determination of susceptibility to CKD and P.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a complex disorder that combines environmental and genetic effects (Goldfarb-Rumyantzev et al., 2006). It represents a progressive and irreversible deterioration of the kidney's functional units, nephrons. It is characterized by reduction of renal mass leading to structural hypertrophy of the remaining nephrons (Lynch et al., 1994). It results from a wide spectrum of diseases such as glomerulonephritis, diabetes, hypertension, and autoimmune diseases (de Rossi & Glick, 1996; Proctor et al., 2005), but its clinical manifestations are largely independent on the initial insult that damaged the kidneys. Loss of renal function arises with accumulation of metabolic waste products which in turn change the normal hemostatic mechanisms that control electrolytic balance (Rose & Bulack, 1988). Dialysis or renal transplant is required to remove toxic products of metabolism from the blood, being the latter the ideal form of treatment (Eigner et al., 1986). In 2005, the prevalence of patients with CKD was 19.2 millions in the United States (Schoolwerth et al., 2006) and 2 millions of patients in Brazil (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006).

Renal patients are also more prone to infectious complications (Stenvinkel et al., 2004). In fact, chronic infections appear to be important causes of persistent systemic inflammation in CKD patients, which in turn have been considered a major risk factor for CKD patients' morbidity and mortality (Naugle et al., 1998; Craig et al., 2002; Foley et al., 2006; Wyatt & Winston, 2006). Regarding complications of infectious nature, periodontal disease has been referred to as a major infectious focus that could enhance levels of systemic inflammation, increasing patients' morbidity (Rahmati et al., 2002).

Periodontal disease or periodontitis (P) is an infectious disorder, where putative periodontopathogens trigger chronic inflammatory and immune responses that are thought to determine the clinical outcome of the disease (Garlet et al., 2004). It is characterized by irreversible loss of tissue support around the teeth, which often leads to tooth loss.

Periodontitis has environment and genetics as determinant factors contributing to the individual variation (Kornman et al., 1997; Kinane & Marshall, 2001). Heritable risk factors may be related to inflammatory or immune

mechanisms that, if rendered ineffective or hyperactive, could enhance the pathogenic potential of bacterial plaque in susceptible individuals (Schenkein & Van Dyke, 2000). According to the American Academy of Periodontology (AAP, 2005), 5 to 15 % of people suffer from severe periodontal disease and 50 % of adults have at least a moderate type of periodontitis. In Brazil, 50 % of the population between 35 and 44 years present some form of periodontal disease, according to Brazil Oral Health Project (PSB, 2003). Periodontitis has been considered a CKD complication (Craig et al., 2002; Marakoglu et al., 2003; Borawski et al., 2007) and its prevalence and severity are suggested to be increased in this population (Kshirsagar et al., 2005; Borawski et al., 2007).

With the increasing number of patients in hemodialysis, the studies have been focusing on CKD complications, mainly related to disturbance of mineral bone metabolism, such as secondary hyperparathyroidism (Khan, 2007), extra-osseous calcification (Floege & Ketteler, 2005), and bone diseases (Jassal et al., 2007). In this context, studies focusing mediators of bone metabolism could contribute to the understanding of mechanisms involved in CKD complications outcome (Moe et al., 2007). Moreover, the main clinical sign that characterizes periodontitis is clinical attachment loss (CAL) caused by alveolar bone resorption (Ebisu & Noiri, 2007).

Bone is a dynamic tissue, which is continuously renovating in a process called “remodelling” (Coen et al., 2002). The process of coordinated formation and resorption of bone may be up- or down-regulated by a wide spectrum of factors like diseases, drug usage, systemic hormones [parathormone (PTH), calcitriol], local cytokines [Interleukin (IL) -1, IL-6] and growth factors [as the Tumour Necrosis Factor (TNF)], bone metabolism mediators [Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B (RANK) and RANK ligand (RANKL)], and genetic polymorphisms (Montalban et al., 1999; Wittersheim et al., 2006).

Osteoprotegerin (OPG), also known as factor of osteoclastic inhibition, is a secreted basic glycoprotein with 401 amino acid residues that belongs to TNF receptor superfamily, and is considered as a bone regulating protein with the capacity to decrease bone resorption (Simonet et al., 1997). It is expressed by a variety of organs and tissues, such as heart, lung, kidney, vessel wall, intestine, stomach, brain, thyroid gland, spinal marrow and bone (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998). This protein has a function to antagonize RANKL, the

main regulator of osteoclastogenesis (Lacey et al., 1998). It is a critical cytokine for the differentiation, activation, and survival of the osteoclasts and acts as a regulator of osteoblast-osteoclast cross-talks and homeostasis (Shalhoub et al., 1999).

The OPG gene was cloned and characterized by Morinaga et al. (1998). The gene located on chromosome 8q23-24 represents a single copy gene with 5 exons spanning 29 kb. The translation termination codon is located in exon 5 and a typical poly (A) addition signal resides 173 nucleotides downstream of the translation termination codon. A major transcription initiation site is present 67 nucleotides upstream of the initiation ATG codon (Morinaga et al., 1998).

Genetic polymorphisms refer to the existence of two or more alleles at a given locus, with an allele frequency of more than 1 % in a population. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) represent the most common form of DNA variation in the human genome, and polymorphic alleles have been implicated in the augment of susceptibility to complex human diseases (Trevilatto et al., 2003; Riemenschneider et al., 2006). Polymorphisms in genes of the host bone metabolism have been associated with CKD complications and periodontitis (Nagaba et al., 1998; de Brito Jr et al., 2004). However, to our knowledge, there are no studies investigating the association between polymorphisms in the OPG gene and CKD, as well as a few studies reporting the relationship between OPG polymorphisms and P. Thus, the aim of this study was to investigate the association between a polymorphism in the untranslated region (UTR) of OPG gene and the susceptibility to CKD and P.

METHODS

Study population

A convenient sample of 224 unrelated, both sexes, mean age 44.9 years (range 23 to 77) was selected from the Dental Clinics of Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) and Pro-Renal Foundation. The patients were from Southern Brazil (Table 1). Subjects completed personal, medical and dental history questionnaires. The study was approved by the Ethical Committee in Research at PUCPR. Subjects signed a consent form after being advised of the nature of the study (approved under protocol 264/10184).

The sample was divided into four groups:

Group 1: 60 individuals without CKD and without P;

Group 2: 50 patients without CKD and with P;

Group 3: 50 patients with CKD, in hemodialysis, and without P;

Group 4: 64 patients with CKD, in hemodialysis, and with P.

Patients without CKD presented glomerular filtration rate > 90 mL/min, estimated according to the Modification of Diet Renal Disease (MDRD) (Levey et al., 1999). Individuals with P showed clinical attachment loss (CAL) ≥ 5 mm, in at least three teeth in two quadrants (Armitage, 1999).

Subjects could not have any of the following exclusion criteria: chronic usage of anti-inflammatory drugs; HIV infection; immunosuppressive chemotherapy; history of any diseases known to severely compromise immune function (for groups 1 and 2); active infection; current pregnancy or lactation; diseases of the oral hard or soft tissues, except caries (and periodontal disease for groups 1 and 3); use of orthodontic appliances; present necrotizing ulcerative gingivitis and periodontitis.

General clinical aspects of CKD patients are shown in table 2.

Clinical parameters of P

Diagnosis of P was made on the basis of clinical parameters, such as probing pocket depth (PPD), and assessment of clinical attachment loss (CAL). Measurements of probing depth and attachment level were recorded at four points around each tooth. Subjects with CAL ≥ 5 mm, in at least three teeth in two quadrants, were considered affected (Armitage, 1999).

The following parameters were recorded: the gingival index (GI); the plaque index (PI), the calculus index (CI), and mobility. The Gingival Index (GI) was developed by Löe and Silness in 1963 (Löe & Silness, 1963) to define the inflammation condition of gingiva. A score of 0 indicates clinically healthy gingivae; 1, mild inflammation; 2, moderate, and 3, severe inflammation. The plaque index (Silness & Löe, 1964) defines the amount of microbial dental plaque on tooth surface. A score of 0 indicates no plaque on tooth; 1, a visible thin film of plaque; 2, moderate accumulation plaque at the gingival margin; 3, abundance of plaque extending into the interdental area. The calculus index (CI) (Greene & Vermillion, 1964) was classified: 0, no calculus; 1, supragingival calculus covering not more than third of the exposed tooth surface; 2,

supragingival calculus covering more than one third but not more than two thirds of the exposed tooth surface; 3, supragingival calculus covering more than two third of the exposed tooth surface or subgingival calculus. Each tooth was given a score from 0-3. All registered scores (GI, PI, and CI) were added and divided by the number of present teeth. Dichotomous (absent or present) measurements were registered for tooth mobility. The periodontal status of all subjects: gingival (GI), plaque (PI), calculus (CI) index, probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), and mobility is shown in table 3.

DNA collection and purification

Cells were obtained through a mouthwash with 3 % glucose solution and scraping of the oral mucosa with a sterile spatula (Trevilatto & Line, 2000). DNA was extracted from epithelial buccal cells with ammonium acetate 10 M and EDTA 1 mM (Aidar & Line, *submitted*).

Analysis of OPG polymorphism

A 331 bp fragment (GenBank accession number AB008821) was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the following primer pair: (F 5' - CCC AGG GGA CAG ACA CCA C - 3' and R 5' - GCG CGC AGC ACA GCA ACT T - 3'). Reaction conditions and cycling parameters were as follows: 1 µL of the genomic DNA was used for PCR amplification in a reaction mixture containing 22.5 µL PCR Supermix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 0.3 µL of each primer. The reactions were performed in a Techne T-512 thermal cycler and consisted of denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles with denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 57°C for 1 min and elongation at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 7 min. Restriction Eragment Length Polymorphism (RFLP) technique was performed in a final reaction volume of 20 µL, using 1 U of *HincII* (5' - GTPyT↓PuAC - 3') (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 10 µL aliquot of PCR products, digested at 37°C overnight (ON). The digested products were separated in 1.7% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium-bromide-UVB illumination. The genotypes were determined by comparing the restriction length polymorphism band patterns with a 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen Life Technologies). The RFLP is formed by a single base transition (T/C) of the OPG gene that creates a *HincII* restriction site. The alleles which result from the cleavage of *HincII* are designated "C" (*HincII* site present, with 2 fragments: 248

and 83 bp) or “T” (*HincII* site absent, with a fragment: 331 bp).

Statistical Analysis

The differences in observed frequencies of polymorphism among the groups were assessed by standard Chi-square (χ^2) and considered significant when p -value was ≤ 0.05 . Comparisons between two groups for nominal variables in tables 2x2 were made using Fisher's exact test. T-student test was used to compare means between two groups. For non-parametric variables U Mann-Whitney test was used to assess differences between groups. Continuous variables were expressed as means and standard deviations. Comparisons of continuous variables were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Kruskal-Wallis test was used for nonparametric multiple comparisons for independent variables. Statistical analysis was performed using statistical software BioEstat 2.0 for Windows, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

The study polymorphism was observed to be located at position -223 in the UTR region of OPG gene (Fig. 1). This polymorphism is referred to as a polymorphism in the OPG gene promoter (position -950) by Brändström et al., (2002) and other authors (Arko et al., 2002; Soufi et al., 2004).

There was not found a statistically significant association between the polymorphism in the OPG gene and CKD or P. Moreover, there were found no association of the polymorphism with clinical parameters of periodontal disease. The allele frequencies and genotype distributions of the OPG polymorphism for all groups are shown in table 4.

DISCUSSION

The identification of the OPG/RANKL/RANK system as the dominant, final mediator of osteoclastogenesis represents a major advance in bone biology. The initial cloning and characterization of OPG as a soluble, decoy receptor belonging to the TNF receptor superfamily was the first step that eventually led to an unraveling of this system. Soon thereafter, the molecule blocked by OPG,

called RANKL, was identified as the key mediator of osteoclastogenesis in both a membrane-bound form expressed on preosteoblastic/stromal cells as well as a soluble form. RANKL, in turn, was shown to bind its receptor, RANK, on osteoclast lineage cells. The important role played by these factors in regulating bone metabolism was demonstrated by the findings of extremes of skeletal phenotypes (osteoporosis and osteopetrosis) in mice with altered expression of these molecules (Bucay et al., 1998; Yamashita et al., 2002).

The RANK/RANKL/OPG regulatory axis is also involved in inflammatory bone destruction induced by pro-inflammatory cytokines such prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha (Boyle et al., 2003). In addition, a number of other mediators of bone metabolism, such as TGF-beta (Takai et al., 1998), PTH (Lee et al., 1999), 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Kitazawa et al., 1999), glucocorticoids (Hofbauer et al., 1999), and estrogen (Hofbauer et al., 1999; Saika et al., 2001) exert their effects on osteoclastogenesis by regulating osteoblastic/stromal cell production of OPG and RANKL. However, not all regulation of osteoclast is exclusively via the osteoblast because calcitonin acts directly on osteoclastic cells (Nicholson et al., 1986), and estrogen has been shown to induce apoptosis of osteoclasts (Hughes et al., 1996).

Osteoprotegerin might protect bone against intensive bone loss resulting from the imbalance of bone kinetics in CKD hemodialysis patients (Avbersek-Luznik et al., 2002). Higher serum OPG and lower serum RANKL were found in CKD patients in hemodialysis (Grzegorzewska & Molt, 2005). Increased serum OPG levels in hemodialysis patients are believed to partly reflect a compensatory response to increased bone loss (Crisafulli et al., 2005). The determination of serum OPG levels in association with PTH levels could be useful in the diagnosis of bone turnover in renal patients (Coen et al., 2002). Besides, it could contribute to prevent patients from developing vascular calcification, a major risk factor for cardiovascular diseases, which in turn is an important mortality indicator in CKD patients (Price et al., 2001).

The OPG expression from gingival tissue was higher in chronic periodontitis than in healthy patients (Garlet et al., 2004), and the change in the levels of this regulator of osteoclast differentiation may play a major role in the bone loss observed in periodontitis (Crotti et al., 2003). Human periodontal ligament cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) inhibit

osteoclastogenesis by producing higher levels of OPG than RANKL via the induction of IL-1 beta and TNF-alpha (Wada et al., 2004). On the other hand, an increased concentration of RANKL and a decreased concentration of OPG were detected in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with periodontitis (Mogi et al., 2004). Also, osteoblasts in culture exposed to periodontopathogens stimulus showed increased expression of RANKL and decreased expression of OPG (Choi et al., 2005). However, levels of OPG in saliva did not show a relationship with periodontal disease and were not correlated with periodontal indexes (Miller et al., 2006). *Porphyromonas gingivalis* upregulated the expression of OPG in human microvascular endothelial cells via a NF-kappaB-dependent pathway; thus, these endothelial cells can act as a source of OPG and thereby may play a role in regulating bone metabolism in periodontitis (Kobayashi-Sakamoto et al., 2004).

A number of polymorphisms in the OPG gene has been described in prior investigations, and associated with bone mineral density (Wynne, et al., 2002; Arko et al., 2005), vertebral fractures (Langdahl et al., 2002), coronary artery disease (Soufi et al., 2004), Paget's disease (Daroszewska et al., 2004), osteoarthritis (Valdes et al., 2004), and osteoporosis (Ohmori et al., 2002; Vidal et al., 2006) in different populations.

To our knowledge, this is the first study investigating the association between polymorphisms in the OPG gene and CKD. There was found no association between the study OPG polymorphism and CKD. We have recently identified an association of an allele of the BsmI VDR gene polymorphism with a protective effect against CKD development in this study population sample (Souza et al., *submitted*). However, other polymorphisms in the OPG gene and/or in other genes of the host bone metabolism response may also be involved in the determination of susceptibility to and/or progression of CKD.

With regards to periodontitis, there are a couple of association studies investigating polymorphisms in the OPG gene. No association was found between aggressive (Soedarsono et al., 2006) or chronic (Wohlfahrt et al., 2006) periodontitis and OPG polymorphisms. Lack of association between an OPG polymorphism and chronic periodontitis was also observed in our study. It is worth mentioning that the investigated polymorphisms in our and in the two other studies reporting periodontitis are limited to the upstream region of the

OPG gene. A physical study considering linkage disequilibrium blocks with a number of polymorphisms representing the whole gene could help understand the real involvement of this gene in the determination of susceptibility to periodontal diseases. Besides, other polymorphisms in genes of the immune-inflammatory and bone metabolism host response may be involved in the modulation of periodontal diseases.

In relation to functionality of this polymorphism, although the study polymorphism is located 129 bp upstream from the TATA box, 13 bp downstream from the activating protein 2-binding site, and 32 bp upstream from a specific protein 1-binding site, it does not seem to interfere with transcription activity of this gene (Soufi et al., 2004).

CONCLUSION

It was found no association of the study OPG gene polymorphism with either chronic kidney disease or with periodontitis. Other studies investigating other polymorphisms in this and other genes of the host response could help clarify the involvement of bone metabolism mediators in the determination of susceptibility to CKD and P.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant from the Araucária Support Foundation for Scientific and Technological Development of Paraná (grant no. 5856).

REFERENCES

- Aidar M, Line SR: Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio. *Braz Dent J. Submitted.*
- American Academy of Periodontology. Epidemiology of Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2005; 76:1406-1419.
- Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4080-4084.
- Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas.* 2005 Jul 16;51(3):270-279.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6. Review.
- Avbersek-Luznik I, Malesic I, Rus I, Marc J. Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med.* 2002 Oct;40(10):1019-1023.
- Borawski J, Wilczynska-Borawska M, Stokowska W, Mysliwiec M. The periodontal status of pre-dialysis chronic kidney disease and maintenance dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Feb;22(2):457-464.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 15;423:337-342.
- Brändström H, Stiger, F, Lind L, Kahan T, Melhus H, Kindmark A. 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 Apr 26;293(1):13-17.
- Brazil Oral Health Project (Projeto Saúde Bucal – Brasil). Condição da saúde bucal da população brasileira. Ministério da Saúde 2003; 36-40.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12:1260-1268.
- Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema*

- denticola, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol*. 2005 May;76(5):813-20.
- Coen G, Ballanti P, Balducci A, Calabria S, Fischer MS, Jankovic L, Manni M, Morosetti M, Moscaritolo E, Sardella D, Bonucci E. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Feb;17(2):233-238.
- Craig RG, Spittle MA, Levin NW. Importance of periodontal disease in the kidney patient. *Blood Purif*. 2002;20(1):113-119.
- Crisafulli A, Romeo A, Floccari F, Aloisi E, Atteritano M, Cincotta M, Aloisi C, Pizzoleo MA, Ruello A, Artemisia A, Valenti A, Frisina N, Teti D, Buemi M. Osteoprotegerin and bone mineral density in hemodiafiltration patients. *Ren Fail*. 2005;27(5):531-539.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):380-387.
- de Brito Junior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP: Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2004;75(8):1090-1095.
- Daroszewska A, Hocking LJ, McGuigan FE, Langdahl B, Stone MD, Cundy T, Nicholson GC, Fraser WD, Ralston SH. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J Bone Miner Res*. 2004 Sep;19(9):1506-1511.
- De Rossi SS, Glick M. Dental considerations for the patient with renal disease receiving hemodialysis. *J Am Dent Assoc*. 1996; 127(2):211-219.
- Ebisu S, Noiri Y. Oral Biofilms and bone resorption *Clin Calcium*. 2007 Feb;17(2):179-184.
- Eigner TL, Jastack JT, Bennet WM. Achieving oral health in patients with renal failure an renal transplants. *J. Am Dent Assoc*. 1986 Oct; 113 (4): 612-616.
- Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Apr;20(4):851-852.
- Foley RN. Infections and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006 Jul;13(3):205-208.

- Garlet GP, Martins JR W, Fonseca BAL Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-679.
- Goldfarb-Rumyantzev AS, Cheung AK, Habib AN, Wang BJ, Lin SJ, Baird BC, Naiman N, Cannon-Albright L. A population-based assessment of the familial component of chronic kidney disease mortality. *Am J Nephrol*. 2006; 26(2): 142-148.
- Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *J Amer Dent Assoc*. 1964 Jan; 68: 7-13.
- Grzegorzewska AE, Mlot M. Using the ratio of serum osteoprotegerin ligand to osteoprotegerin to evaluate renal osteodystrophy in dialysis patients. *Adv Perit Dial*. 2005;21:188-193.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.. *Endocrinology*. 1999 Oct;140(10):4382-4389.
- Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1132-1136.
- Jassal SK, von Muhlen D, Barrett-Connor E. Measures of renal function, BMD, bone loss, and osteoporotic fracture in older adults: the Rancho Bernardo study. *J Bone Miner Res*. 2007 Feb;22(2):203-210.
- Khan S. Secondary Hyperparathyroidism Is Associated with Higher Cost of Care among Chronic Kidney Disease Patients with Cardiovascular Comorbidities. *Nephron Clin Pract*. 2007;105(4):c159-164.
- Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J*. 2001 Mar: 46(1): 2–12.
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Apr 14; 1445(1):134-141.

- Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Chiba I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 27;315(1):107-112.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG JR, Higginbottom FI; Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan; 24(1): 72-77.
- Kshirsagar AV, Moss KL, Elter JR, Beck JD, Offenbacher S, Falk RJ. Periodontal disease is associated with renal insufficiency in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Am J Kidney Dis*. 2005 Apr;45(4):650-657.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-176.
- Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2002 Jul;17(7):1245-1255.
- Lee S-K, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999 Aug;140(8):3552-3561.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999 Mar 16;130(6):461-470.
- Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. i. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963 dec;21:533-551.
- Lynch MA, Brightman VJ, Greenberg MS. *Burket's Oral Medicine - Diagnosis and Treatment*. 9th ed, Philadelphia, J.B.Lippincott Co. 1994; 487- 509.

- Marakoglu I, Gursoy UK, Demirer S, Sezer H: Periodontal status of chronic renal failure patients receiving hemodialysis. *Yonsei Med J* 2003;44(4):648-652.
- Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):322-9 Comment in: *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):284-286.
- Moe SM, Drueke T, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2007 Jan;14(1):3-12.
- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004 Feb;83(2):166-169.
- Montalban C, Garcia-Unzueta MT, Defrancisco ALM, Amado JA. Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: relationship with serum PTH and bone remodeling markers. *Horm Metab Res.* 1999 Jan;31(1):14-17.
- Morinaga, T; Nakagawa, N; Yasuda, H; Tsuda, E; Higashio, K . Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem.* 1998 Jun 15;254(3):685-691.
- Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y: Vitamin D receptor gene polymorphisms affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32:464-469.
- Naugle K, Darby ML, Bauman DB, Lineberger LT, Powers R: The oral health status of individuals on renal dialysis. *Ann. Periodontol.* 1998;3:197-205.
- Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986 Aug;78(2):355-360.
- Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002;47(8):400-406.

- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin Inhibits Artery Calcification Induced by Warfarin and by Vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1610-1616.
- Proctor R, Kumar N, A. Stein, D. Moles, and S. Porter. Oral and Dental Aspects of Chronic Renal Failure. *J Dent Res.* 2005 Mar;84(3):199-208. Review.
- Rahmati MA, Craig RG, Homel P, Kaysen GA, Levin NW: Serum Markers of Periodontal Disease Status and Inflammation in Hemodialysis Patients *Am J Kidney Dis.* 2002;40(5):983-989.
- Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Muller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2006 Aug 15;15(16):2446-2456.
- Rose BD, Bulack RM. *Manual of clinical problems in nephrology.* Boston, Toronto: Little, Brown CO 1988: 371.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17 beta-Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alfa. *Endocrinology.* 2001 Jun;142(6):2205-2212.
- Schenkein HA, Van Dyke TE. Early-onset periodontitis: Systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol 2000.* 1994 Oct;6:7-25.
- Schoolwerth AC, Engलगau MM, Hostetter TH, Rufo KH, Chianchiano D, McClellan WM, Warnock DG, Vinicor F. Links Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis.* 2006 Apr;3(2):A57.
- Shalhoub V, Faust J, Boyle W J, et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem.* 1999 Feb 1;72(2):251-261.
- Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1964; 22: 121-135.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen Q, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R,

Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay , Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-319.

Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006. Available: <http://www.sbn.org.br/Censo/2006/censoSBN2006.ppt#12>

Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D, Ishihara Y, Suzuki M, Noguchi T, Sakaki Y, Yamaguchi A, Kojima T. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006 Oct;41(5):397-404.

Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch , Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug;89(8):3764-3768.

Souza CM, Braosi APR, Luczyszyn SM, Ávila AR, De Brito Junior R, Ignácio SA, Probst CM, Riella MC, Sotomaior VS, Pecoits-Filho R, Trevilatto PC. Analysis of the Association between Polymorphisms in the Gene of the Vitamin D Receptor and the Susceptibility to Chronic Kidney Disease and Periodontitis. *Blood Purif*. *Submitted*.

Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger O. Novel approaches in an integrated therapy of inflammatory-associated wasting in end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2004 Nov-Dec;17(6):505-515.

Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27091-27096.

Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun;18(1):6-9.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003 May;30(5):438-442.

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD. Association study of candidate genes for the

- prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Aug ;50 (8):2497-2507.
- Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas.* 2006 Mar 20;53(4):386-395.
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone.* 2004 Sep;35(3):629-635.
- Wittersheim E, Mesquita M, Demulder A, Guns M, Louis O, Melot C, Dratwa M, Bergmann P. OPG, RANK-L, bone metabolism, and BMD in patients on peritoneal dialysis and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2006 Jun;39(6):617-622.
- Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006 Mar;77(3):426-436.
- Wyatt CM, Winston J. Renal disease in patients with HIV. *Curr Infect Dis Rep.* 2006 Jan;8(1):76-81.
- Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int.* 2002; 71:26–35.
- Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M. Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology.* 2002 Dec;143(12):4711-4717.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1329-1337.

Table 1. Baseline characteristics in all groups.

	Group 1 (n=60)	Group 2 (n=50)	Group 3 (n=50)	Group 4 (n=64)
<i>Ethnic Group</i> n (%)				
Caucasoid	47 (78.3)	38 (76)	35 (70)	44 (68.8)
Afro-American	4 (6.7)	11 (22)	13 (26)	5 (7.8)
Mullato	9 (15.0)	1 (2)	2 (4)	15 (23.4)
<i>Age</i> (years; range)	37.8±9.6 (20-70)	40.8±9.4 (20-61)	45.2±12.9 (23-74)	54.5±12.2 (26-77)
<i>Gender</i> n (%)				
Female	43 (71.7)	33 (66)	16 (34)	23 (35.9)
Male	17 (28.3)	17 (34)	34 (66)	41 (64.1)

Group 1: healthy patients. Group 2: without CKD and with P. Group 3: with CKD and without P. Group 4: presenting CKD and P.

Table 2. Baseline clinical parameters of the chronic kidney disease patients.

	Without P ^a (n=50)	With P (n=64)
<i>Main cause of CKD</i>^b n (%)		
Chronic glomerulonephritis	19 (38)	21 (32.8)
Hypertensive nephropathy	14 (28)	10 (15.9)
Diabetic nephropathy	7 (14)	14 (22.2)
Other/Unknown	10 (20)	19 (30.2)
<i>Duration of HD</i>^c <i>treatment (months)</i>[†]	47.8±48.0	47.2±43.3
<i>Systemic condition</i> n (%)		
Diabetes	7 (14)	17 (26.9)
Hepatitis	11 (22)	17 (26.9)
CVD ^d	10 (20)	17 (26.5)
Hypertension	33 (66)	54 (85.7)
<i>Current medication</i> n (%)		
Antihypertensives	35 (70)	50 (78.1)
Diuretics	10 (2)	23 (36.5)
Calcium carbonate	34 (68)	47 (73.4)
Vitamin D (calcitriol)	9 (18)	7 (11.1)
Antiplatelet agents	3 (6)	5 (7.9)
Others	41 (82)	51 (80.9)
<i>Habits</i> n (%)		
Smoking	11 (22)	16 (25.3)

^aPeriodontitis; ^bChronic kidney disease; ^cHemodialysis; ^dCardiovascular disease;

[†]Mean±Standart deviation. Group 1: healthy patients. Group 2: without CKD and with P. Group 3: with CKD and without P. Group 4: presenting CKD and P.

Table 3. Periodontal status of the study population.

	Group 1 (n=60)	Group 2 (n=50)	Group 3 (n=50)	Group 4 (n=64)	<i>p</i> value
<i>Gingival Index</i> [†]	0.2±0.4	1.5±0.9	0.5±0.6	1.7±0.7	0.0001 *
<i>Plaque Index</i> [†]	0.3±0.4	1.3±1.0	0.5±0.8	1.0±0.9	0.0001 *
<i>Calculus Index</i> [†]	0.2±0.2	1.0±0.9	0.3±0.5	0.7±0.9	0.0001 *
<i>PPD</i> ^a (mm) [†]	1.5±2.4	4.6±1.0	2.0±2.0	3.6±1.1	0.0001 *
<i>CAL</i> ^b (mm) [†]	2.2±2.6	6.1±0.9	2.6±2.7	5.3±1.3	0.0001 *
<i>Mobility</i> (Y/N)	0/60	21/29	0/50	32/32	0.0001 *

^aProbing pocket depth; ^bClinical attachment level; [†]Mean±Standart deviation; *ANOVA.

Group 1: healthy patients. Group 2: without CKD and with P. Group 3: with CKD and without P. Group 4: presenting CKD and P.

Table 4. Allele frequency and genotype distribution of the OPG single nucleotide polymorphism (SNP).

SNP n (%)	Group 1 (n=60)	Group 2 (n=50)	Group 3 (n=50)	Group 4 (n=64)	Chi- square
Genotypes					
T T	47 (78.3)	41 (82.0)	43 (86.0)	52 (81.3)	$\chi^2=3.86$ $p=0.69$
T C	5 (8.3)	6 (12.0)	3 (6.0)	4 (6.2)	
C C	8 (13.4)	3 (6.0)	4 (8)	8 (12.5)	
Alleles					
T	99 (82.5)	88 (88.0)	89 (89.0)	108 (84.4)	$\chi^2=2.50$ $p=0.47$
C	21 (17.5)	12 (12.0)	11 (11.0)	20 (15.6)	

Group 1: healthy patients. Group 2: without CKD and with P. Group 3: with CKD and without P. Group 4: presenting CKD and P.

cctcagagccccgcggagacagcagccgccttggtcctcagcccgggtggcttttttcccctgctctcccagggg
gacagacaccaccgccccacccctcacgccccacctccctgggggatCCTTTCCGCCCCAGCC
 CTGAAAGC*gttaa***T/C**CTGGAGCTTTCTGCACACCCCCGACCGCTCCCGC
 CCAAGCTTCCTAAAAAAGAAAGGTGCAAAGTTTGGTCCAGGATAGAAAAAT
 GACTGATCAAAGGCAGGCGATACTTCCTGTTGCCGGGACGCTATATATAA
 CGTGATGAGCGCACGGGCTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTCGCCCAGC
 CGCCGCCTCCAAGCCCCTGAGGTTTCCGGGGACCACA*atgaacaagttgctgtgc
tgcgcgctcggtgtaagtccctggggccagccgacgggtgccgggcgctggggaggctgctgccacctggc
 tcccaacctcccagcggaccggcggggagaaggctccactcgctccctcccaggagaggctggggtagg
 ctggagcaggaaaccgctttcaagttatgccatgcttcccctaggg

Fig. 1. Nucleotide sequence of the human OPG gene (AB008821). The underlined bases represent the primers for the OPG polymorphism. Capital letters indicate 5' UTR. (*) represents the beginning of the first exon. Italicized nucleotides show the restriction site for *HincII*. Boldface bases represent the polymorphism (T/C).

Artigo em Português

Análise da Associação entre um Polimorfismo no Gene da Osteoprotegerina (OPG) e a suscetibilidade à Doença Renal Crônica e à Periodontite

Carla Spagliare Baioni*, Cleber Machado de Souza[†], Ana Paula Ribeiro Braosi[†], Sônia Mara Luczyszyn[†], Marco Antonio Dias da Silva[‡], Sergio Aparecido Ignácio[¶], José Rocha Faria-Neto[¶], Miguel Carlos Riella[§], Roberto Pecoits-Filho[¶], Paula Cristina Trevilatto[¶]

* Mestranda em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901.

† Doutorandos em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901.

‡ Professor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista de São Paulo (UNESP-SJC), Eng. Francisco José Longo, 777, São José dos Campos, SP, Brasil, 12245-000.

¶ Professores da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil, 80215-901

§ Professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, 80215-901, Brasil e Presidente da Fundação Pró-Renal, Rua Vicente Machado, 1290, Batel, Curitiba, PR, Brasil, 80440-020.

.

Autor correspondente:

Paula Cristina Trevilatto, DDS, PhD

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR

80215-901, Brasil

Fone/Fax: +55 (41) 3271-2618 / +55 (41) 3271-1657

e-mail: pctrev@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivos: A doença renal crônica (DRC) é uma desordem complexa, que pode resultar em diversas complicações envolvendo distúrbios do metabolismo mineral, como calcificações e doenças ósseas. Os pacientes renais são também mais propensos a infecções. Considerando as complicações de natureza infecciosa, a periodontite (P) parece ser uma causa importante da inflamação sistêmica persistente em pacientes com DRC, aumentando a morbidade nesta população. Adicionalmente, a P parece ser mais prevalente e severa nos pacientes com DRC. A periodontite é caracterizada pela perda irreversível do nível de inserção clínica (NIC) causada pela reabsorção alveolar óssea em torno dos dentes, que conduz freqüentemente à perda dentária. Neste contexto, os estudos que focam os mediadores do metabolismo ósseo podem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na DRC e na P. A osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator de inibição osteoclástica, é uma proteína que antagoniza o Ligante Ativador do Receptor do fator Nuclear Kappa B (RANKL), principal regulador da osteoclastogênese. Polimorfismos são a principal fonte da variação genética em seres vivos e os polimorfismos de base única (SNPs) têm sido descritos como moduladores importantes da suscetibilidade a doenças comuns na população em geral. O objetivo deste estudo foi de investigar a associação entre um polimorfismo na região 5' não-traduzida (UTR) do gene da OPG e a suscetibilidade à DRC e à P. **Material e Método:** Uma amostra de 224 indivíduos sem e com DRC (em hemodiálise) foi dividida em grupos com e sem P. Um polimorfismo na região UTR do gene da OPG foi analisado por PCR-RFLP. P. As diferenças observadas entre as freqüências do polimorfismo entre os grupos foram analisadas pelo teste qui-quadrado e consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. **Resultados:** Não foi encontrada associação entre o polimorfismo no gene do OPG e a suscetibilidade à DRC ou à P. **Conclusão:** O polimorfismo localizado na posição -223 na região UTR (outora denominado -950) não esteve associado com a suscetibilidade à DRC ou à P. Estudos adicionais investigando outros polimorfismos, neste e em outros genes da resposta do hospedeiro, podem ajudar a esclarecer a participação de mediadores do metabolismo ósseo na determinação da suscetibilidade à DRC e à P.

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é uma desordem complexa que combina efeitos ambientais e genéticos (Goldfarb-Rumyantzev et al., 2006). Esta doença representa uma deterioração progressiva e irreversível das unidades funcionais dos rins, os nefros. É caracterizada pela redução da massa renal que leva à hipertrofia estrutural dos nefros remanescentes (Lynch et al., 1994). Ela resulta em um amplo espectro de doenças, tais como glomerulonefrite, diabetes, hipertensão, uropatia e doenças auto-imunes (De Rossi & Glick, 1996; Proctor et al., 2005), mas suas manifestações clínicas são amplamente independentes da agressão inicial que danificou os rins. A perda da função renal inicia-se com o acúmulo de produtos metabólicos que alteram, por sua vez, os mecanismos homeostáticos normais que controlam o equilíbrio eletrolítico (Rosa & Bulack, 1988). Para que haja a remoção dos produtos tóxicos de metabolismo é necessária a realização de diálise do sangue ou o transplante renal, que é a forma ideal de tratamento (Eigner et al., 1986). Em 2005, a prevalência de pacientes renais era de 19,2 milhões nos Estados Unidos (Schoolwerth et al., 2006) e 2 milhões de pacientes no Brasil (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006).

Pacientes renais são mais propensos a infecções (Stenvinkel et al., 2004). Em verdade, as infecções crônicas parecem ser importantes causas de inflamação sistêmica persistente em pacientes com DRC que, por sua vez, têm sido consideradas como um fator de risco significativo para a morbidade e mortalidade de pacientes com DRC (Naugle et al., 1998; Craig et al., 2002; Foley et al., 2006; Wyatt & Winston, 2006). Com relação a complicações de natureza infecciosa, a doença periodontal foi referida como foco infeccioso que poderia aumentar níveis sistêmicos inflamatórios, elevando a morbidade nesses pacientes (Rahmati et al., 2002).

A periodontite (P) é uma doença infecciosa, onde periodontopatógenos específicos provocam inflamação crônica e resposta imune que determinam o resultado clínico da doença (Garlet et al., 2004). É caracterizada pela perda irreversível dos tecidos de suporte ao redor dos dentes, que conduz freqüentemente à perda dos dentes.

A periodontite é determinada por fatores genéticos e ambientais, que

contribuem para a variação individual (Kornman et al., 1997; Kinane & Marshall, 2001). Fatores de risco hereditários podem influenciar mecanismos inflamatórios ou imunes que, se ineficazes ou exacerbados, aumentam o potencial patogênico do biofilme em indivíduos suscetíveis (Schenkein & Van Dyke, 2000). De acordo com a Academia Americana de Periodontia (AAP, 2005), 5 a 15 % das pessoas apresentam doença periodontal severa e 50 % dos adultos têm pelo menos um tipo de periodontite moderada. No Brasil, 50 % da população entre 35 e 44 anos apresentam alguma forma de doença periodontal de acordo com o Programa de Saúde Bucal do Brasil (PSB, 2003). A periodontite tem sido considerada uma complicação da DRC (Craig et al., 2002; Marakoglu et al., 2003; Borawski et al., 2007) e sua prevalência e severidade parecem estar aumentadas nesta população (Kshirsagar et al., 2005; Borawski et al., 2007).

Com o número crescente de pacientes em hemodiálise, os estudos têm focado em complicações da DRC, relacionadas principalmente aos distúrbios do metabolismo mineral ósseo, como o hiperparatireoidismo secundário (Khan, 2007), calcificações extra-ósseas (Floege & Ketteler, 2005) e doenças ósseas (Jassal et al., 2007). Neste contexto, os estudos que focalizam os mediadores do metabolismo ósseo poderiam contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão das complicações da DRC (Moe et al., 2007). O sinal clínico principal que caracteriza a periodontite é a perda do nível de inserção clínica (NIC) causada pela reabsorção óssea alveolar (Ebisu & Noiri, 2007).

O osso é um tecido dinâmico, continuamente renovado em um processo chamado de “remodelação” (Coen et al., 2002). O processo coordenado de formação e reabsorção óssea pode ser regulado para cima ou para baixo por um amplo espectro de fatores, como: doenças, drogas, hormônios sistêmicos [paratormônio (PTH), calcitriol], citocinas locais [Interleucinas (IL) -1, IL-6] e fatores de crescimento [como o fator de necrose tumoral (TNF)], mediadores do metabolismo ósseo [Receptor Ativador do fator Nuclear Kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL)], e polimorfismos genéticos (Montalban et al., 1999; Wittersheim et al., 2006).

A osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator de inibição osteoclástica, é uma glicoproteína secretada de 401 aminoácidos, pertencente

à superfamília do receptor do TNF, considerada como uma proteína capaz de diminuir a reabsorção óssea (Simonet et al., 1997). É expressa por uma variedade de órgãos e tecidos, tais como coração, pulmão, rim, parede dos vasos, intestino, estômago, cérebro, glândula tireóide e osso (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Esta proteína tem a função de antagonizar o RANKL, principal regulador da osteoclastogênese (Lacey et al., 1998). É uma citocina crítica para a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, agindo como um regulador da homeostase entre osteoblastos e osteoclastos (Shalhoub et al., 1999).

O gene da OPG foi clonado e caracterizado por Morinaga e colaboradores (1998). O gene está situado no cromossomo 8q23-24 e representa uma única cópia do gene com 5 éxons, medindo 29 kb. O códon terminal de tradução está situado no éxon 5 e uma típica adição de cauda poly-A reside 173 nucleotídeos posterior à terminação da tradução. O local principal de iniciação da transcrição está 67 nucleotídeos acima do códon de iniciação da transcrição (Morinaga et al., 1998).

Polimorfismos genéticos referem-se à existência de dois ou mais alelos em um dado *locus*, com uma frequência alélica maior do que 1 % na população. Polimorfismos de base única (SNPs) representam a variação mais comum do DNA no genoma humano, e alelos polimórficos têm sido implicados no aumento da suscetibilidade a doenças humanas complexas (Trevilatto et al., 2003; Riemenschneider et al., 2006). Polimorfismos em genes do metabolismo ósseo do hospedeiro foram associados com complicações da DRC e da periodontite (Nagaba et al., 1998; de Brito Jr et al., 2004). Entretanto, parece não haver nenhum estudo investigando a associação entre polimorfismos no gene da OPG e a DRC, bem como há poucos estudos de associação entre polimorfismos no gene da OPG e P. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre um polimorfismo na região UTR do gene da OPG e a suscetibilidade à DRC e à P.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

Uma amostra de 224 pacientes de ambos os sexos, com a média de idade de

44,9 anos (variando de 23 a 77 anos) foi selecionada nas clínicas odontológicas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e da Fundação Pró-Renal. Os pacientes eram da região sul do Brasil (Tabela 1). Os indivíduos completaram um questionário pessoal contendo história médica e odontológica, dentro de um protocolo aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional, e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após serem avisados da natureza do estudo (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, sob o registro número 264/10184).

As amostras foram divididas em quatro grupos:

Grupo 1: 60 indivíduos sem DRC [taxa de filtração glomerular > 90 mL/min, estimada de acordo com a fórmula MDRD (Levey et al., 1999)] e sem P;

Grupo 2: 50 pacientes sem DRC e com P [NIC $\geq$ 5 mm em pelo menos 3 dentes e em pelo menos em 2 quadrantes] (Armitage, 1999);

Grupo 3: 50 pacientes com DRC, em hemodiálise, e sem P;

Grupo 4: 64 indivíduos com DRC, em hemodiálise, e com P.

Os indivíduos não apresentavam nenhuma das seguintes condições: uso crônico de drogas antiinflamatórias; infecção por HIV; terapia imunossupressora; história de nenhuma doença conhecida que pudesse comprometer a função imune (para os grupos 1 e 2); infecção ativa; gravidez e amamentação correntes; doenças dos tecidos moles e duros da boca, exceto cáries (e doença periodontal para os grupos 1 e 3); uso de aparelho ortodôntico; gengivite ou periodontite necrozante aguda (GUNA/PUNA).

A tabela 2 mostra o estado clínico geral dos pacientes com DRC.

Parâmetros clínicos da P

O diagnóstico de P foi realizado com base em parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem (PS) e avaliação do nível de inserção clínica (NIC). Medidas de profundidade de sondagem e inserção clínica foram registradas em quatro pontos ao redor de cada dente. Indivíduos com NIC $\geq$ 5 mm em pelo menos 3 dentes e em ao menos 2 quadrantes, eram considerados afetados (Armitage, 1999).

Os seguintes parâmetros clínicos foram registrados: Índice Gengival (IG), Índice de Placa (IP), Índice de Cálculo (IC) e Mobilidade. O Índice Gengival (IG) foi desenvolvido por Løe em 1967 para definir a condição inflamatória da gengiva. Escore zero (0) indica gengiva clinicamente saudável;

um (1), inflamação leve; *dois* (2), inflamação moderada, e *três* (3), inflamação severa. O Índice de Placa (Silness & Løe, 1964) define o acúmulo de biofilme dental microbiana na superfície do dente. Classifica-se em *zero* (0) a ausência de depósitos de placa; *um* (1) a visualização da placa após sua remoção com o uso da sonda periodontal na margem gengival; *dois* (2) a placa clinicamente visível; *três* (3) a placa abundante. O Índice de Cálculo (Greene & Vermillion, 1964) foi classificado em *zero* (0), nenhum cálculo presente; *um* (1), cálculo supragengival cobrindo até um terço da superfície dental exposta; *dois* (2), cálculo supragengival cobrindo mais do que um terço, mas não mais que dois terços da superfície dental exposta; *três* (3), cálculo supragengival cobrindo mais do que dois terços da superfície dental exposta. Todos os escores registrados foram somados e divididos pelo número de dentes presentes. Medidas dicotômicas (ausência e presença) foram registradas para o parâmetro Mobilidade. O estado periodontal de todos os indivíduos foi registrado: Índice Gengival (IG), Índice de Placa (IP), Índice de Cálculo (IC) e Mobilidade, e mostrado na tabela 3.

Coleta e purificação de DNA

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por um bochecho com solução de glicose 3 %, por 1 min, e leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada (Trevilatto et al., 2000). O DNA foi extraído com acetato de amônio 10 M e EDTA 1 mM (Aidar & Line, *submetido*).

Análise do polimorfismo no gene da OPG

Um fragmento de 331 pb (acesso em GenBank AB08821) foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os seguintes pares de *primers*: (F 5' - CCC AGG GGA CAG ACA CCA C - 3' e R 5' - GCG CGC AGC ACA GCA ACT T - 3'). Condições de reação e de ciclagem foram as seguintes: 1 µL de DNA genômico foi usado para a amplificação por PCR em uma mistura contendo 22,5 µL de PCR *Supermix* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 0,3 µL de cada *primer*. As reações foram realizadas em um termociclador T-512 e consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 7 min. A técnica de análise de polimorfismo com o uso de enzima de restrição (RFLP) foi realizada em um volume final de 20 µL, com a digestão

de 10 µL de produto de PCR com 1 U da enzima de restrição *HincII* (5' GTPyT↓PuAC 3') (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 37°C overnight (ON). O produto de digestão foi separado por eletroforese em um gel de agarose a 1,7 % e visualizado em brometo de etídio com iluminação UV. Os genótipos foram determinados por comparação dos padrões das bandas geradas pela enzima de restrição com um marcador 11 kb *plus* DNA *ladder* (Invitrogen Life Technologies). O sítio de restrição é formado por uma simples troca de base (T/C) na sequência gênica que cria um local de clivagem pela enzima *HincII*. Os alelos resultantes da clivagem da *HincII* são chamados de “C” (presença do sítio de restrição pela *HincII*, com a geração de dois fragmentos: 248 e 83 pb) ou “T” (ausência do sítio de restrição da *HincII*, com um fragmento: 331pb).

Análise estatística

As significâncias das diferenças nas frequências observadas do polimorfismo entre os grupos foram acessadas pelo teste Qui-quadrado (χ^2) e as diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p era $< 0,05$. Comparações entre os dois grupos para variáveis nominais em tabelas 2x2 foram feitas pelo teste exato de Fisher. O teste “t” de *student* foi usado para comparar médias entre dois grupos. Para variáveis não-paramétricas o teste de U Mann-Whitney foi usado para acessar diferenças entre os grupos. Variáveis contínuas foram expressas pela média e desvio padrão. Comparações de variáveis contínuas foram realizadas usando ANOVA. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações múltiplas não-paramétricas de variáveis independentes. As análises estatísticas foram realizadas com os *softwares* BioEstat 2.0 para Windows e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTADOS

O polimorfismo estudado foi observado estar situado na posição -223 da região UTR do gene da OPG (Fig. 1). Este polimorfismo foi referido como estando no promotor do gene da OPG (posição -950) por Brändström e colaboradores (2002) e por outros autores (Arko et al., 2002; Soufi et al., 2004).

Não foi encontrada associação entre o polimorfismo no gene da OPG e a DRC ou a P. Além disso, não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo estudado com parâmetros clínicos da doença periodontal. As frequências alélicas e as distribuições genotípicas do polimorfismo da OPG para todos os grupos são mostradas na tabela 4.

DISCUSSÃO

A identificação do sistema OPG/RANKL/RANK como mediadores dominantes da osteoclastogênese representa um grande avanço na biologia óssea. A clonagem e caracterização inicial da OPG como um receptor solúvel pertencente à superfamília do receptor TNF foram as primeiras etapas de elucidação deste sistema. Logo depois disso, a molécula bloqueada pela OPG, chamada RANKL, foi identificada como o mediator-chave da osteoclastogênese, expressa tanto na membrana quanto em células pré-osteoblásticas e do estroma, também encontrada na sua forma solúvel. O RANKL foi mostrado, por sua vez, unir-se ao seu receptor, RANK, em células da linhagem osteoclástica. O papel importante interpretado por estes fatores na regulação do metabolismo ósseo foi demonstrado pelos achados de fenótipos extremos (osteoporose e osteopetrose) em camundongos com expressão alterada destas moléculas (Bucay et al., 1998; Yamashita et al., 2002).

O eixo regulatório RANK/RANKL/OPG está envolvido também na destruição óssea inflamatória induzida por citocinas pró-inflamatórias, como as prostaglandinas E₂ (PGE₂), IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa (Boyle et al., 2003). Além disso, um número de outros mediadores do metabolismo ósseo, tais como TGF-beta (Takai et al., 1998), PTH (Lee et al., 1999), 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Kitazawa et al., 1999), glicocorticóides (Hofbauer et al., 1999) e estrógeno (Hofbauer et al., 1999; Saika et al., 2001) exercem seus efeitos na

osteoclastogênese, regulando a produção de OPG e de RANKL pelas células osteoblásticas/estroma. Entretanto, nem toda a regulação dos osteoclastos é exclusivamente feita através dos osteoblastos. A calcitonina age diretamente nas células osteoclásticas (Nicholson et al., 1986) e o estrógeno foi mostrado induzir a apoptose em osteoclastos (Hughes et al., 1996).

A OPG pode proteger o osso contra a perda óssea severa, induzida pelo desequilíbrio da cinética óssea nos pacientes com DRC em hemodiálise (Avbersek-Luznik et al., 2002). Maiores níveis de OPG sérico e níveis mais baixos de RANKL sérico foram encontrados em pacientes com DRC em hemodiálise (Grzegorzewska & Mlot, 2005). Níveis séricos mais elevados de OPG em pacientes em hemodiálise são acreditados refletir em parte uma resposta compensatória à perda óssea aumentada (Crisafulli et al., 2005). A determinação dos níveis séricos de OPG em associação com níveis de PTH poderia ser útil no diagnóstico do *turnover* ósseo em pacientes renais (Coen et al., 2002). Adicionalmente, essa determinação poderia contribuir para prevenir que os pacientes desenvolvam calcificações vasculares, que é um fator de risco determinante para a doença cardiovascular, a qual, por sua vez, é um indicador importante de mortalidade em pacientes com DRC (Price et al., 2001).

A expressão de OPG no tecido gengival foi mais elevada na doença periodontal crônica que em pacientes saudáveis (Garlet et al., 2004), e alterações nos níveis deste regulador de diferenciação osteoclástica podem ter um papel central na perda óssea observada na periodontite (Crotti et al., 2003). Células do ligamento periodontal humano estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS) inibem a osteoclastogênese produzindo níveis mais elevados de OPG do que RANKL, pela indução de IL-1 beta e de TNF-alfa (Wada et al., 2004). Por outro lado, uma concentração aumentada de RANKL e uma concentração diminuída de OPG foram detectadas no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite (Mogi et al., 2004). Também, osteoblastos em cultura, expostos a estímulos periodontopatogênicos, mostraram uma expressão aumentada de RANKL e decréscimo da expressão de OPG (Choi et al., 2005). Entretanto, os níveis de OPG na saliva não mostraram relação com a doença periodontal e não foram correlacionados com os índices periodontais (Moleiros et al., 2006). *Porphyromonas gingivalis* hiper-regularam a expressão de OPG

em células microvasculares endoteliais humanas via dependente de NF-kappa B. Assim, células endoteliais poderiam agir como uma fonte de OPG e, desse modo, ter um papel na regulação do metabolismo ósseo na periodontite (Kobayashi-Sakamoto et al., 2004).

Um número de polimorfismos no gene da OPG tem sido descrito em investigações prévias, e foram associados com a densidade mineral óssea (Wynne, et al., 2002; Arko et al., 2005), fraturas vertebrais (Langdahl et al., 2002), doença arterial coronariana (Soufi et al., 2004), doença de Paget (Daroszezwska et al., 2004), osteoartrite (Valdes et al., 2004) e osteoporose (Ohmori et al., 2002; Vidal et al., 2006) em diferentes populações.

No nosso entendimento, este é o primeiro estudo investigando a associação entre um polimorfismo no gene do OPG e a DRC. Não foi encontrada nenhuma associação entre o polimorfismo da OPG estudado e a DRC. Nós verificamos recentemente a associação entre um alelo do polimorfismo *BsmI*, no gene do VDR, com um efeito protetor contra o desenvolvimento da DRC na amostra estudada (Souza et al., 2007, *submetido*). Entretanto, outros polimorfismos no gene da OPG e/ou em outros genes da resposta do metabolismo ósseo do hospedeiro podem também estar envolvidos na determinação da suscetibilidade e/ou progressão da DRC.

Considerando a periodontite, há dois estudos de associação investigando polimorfismos no gene da OPG. Nenhuma associação foi encontrada entre a periodontite agressiva (Soedarsono et al., 2006) e a periodontite crônica (Wohlfahrt et al., 2006) e o gene da OPG. Ausência de associação entre um polimorfismo no gene da OPG e a periodontite crônica foi observada também em nosso estudo. Vale a pena mencionar que os polimorfismos investigados no nosso e nos outros dois estudos em pacientes com periodontite estão limitados à região inicial do gene da OPG. Um estudo físico considerando blocos de desequilíbrio de ligação com um número de polimorfismos que representem o gene inteiro poderia auxiliar na compreensão da real participação do gene da OPG na determinação da suscetibilidade às doenças periodontais. Adicionalmente, outros polimorfismos em genes da resposta imuno-inflamatória e do metabolismo ósseo do hospedeiro podem estar envolvidos na modulação das doenças periodontais.

Com relação à funcionalidade deste polimorfismo, embora o

polimorfismo estudado esteja 129 pb acima da caixa de transcrição TATA, 13 pb abaixo do sítio de ligação ativador da proteína-2, e 32 pb acima do sítio de ligação específico da proteína-1, ele não parece interferir com a atividade da transcrição deste gene (Soufi et al., 2004).

CONCLUSÃO

Não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo estudado no gene OPG com a doença renal crônica ou com a periodontite.

Estudos adicionais investigando outros polimorfismos, neste e em outros genes da resposta do hospedeiro, podem ajudar a esclarecer a participação de mediadores do metabolismo ósseo na determinação da suscetibilidade à DRC e à P.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (processo nº 5856).

REFERÊNCIAS

- Aidar M, Line SR: Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio. Braz dent J. Submitted.
- American Academy of Periodontology. Epidemiology of Periodontal Disease. J Periodontol. 2005; 76:1406-1419.
- Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Sep;87(9):4080-4084.
- Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. Association of the osteoprotegerin gene polimorfismos with bone mineral density in postmenopausal women. Maturitas. 2005 Jul 16;51(3):270-279.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999 Dec;4(1):1-6. Review.
- Avbersek-Luznik I, Malesic I, Rus I, Marc J. Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. Clin Chem Lab Med. 2002 Oct;40(10):1019-1023.
- Borawski J, Wilczynska-Borawska M, Stokowska W, Mysliwiec M. The periodontal status of pre-dialysis chronic kidney disease and maintenance dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2007 Feb;22(2):457-464.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003; 15;423:337-342.
- Brändström H, Stiger, F, Lind L, Kahan T, Melhus H, Kindmark A. A single nucleotide polimorfismo in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Apr 26;293(1):13-17.
- Brazil Oral Health Project (Projeto Saúde Bucal – Brasil). Condição da saúde bucal da população brasileira. Ministério da Saúde 2003; 36-40.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1998; 12:1260-1268.
- Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by Porphyromonas gingivalis, Treponema

- denticola, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol*. 2005 May;76(5):813-820.
- Coen G, Ballanti P, Balducci A, Calabria S, Fischer MS, Jankovic L, Manni M, Morosetti M, Moscaritolo E, Sardella D, Bonucci E. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Feb;17(2):233-238.
- Craig RG, Spittle MA, Levin NW. Importance of periodontal disease in the kidney patient. *Blood Purif*. 2002;20(1):113-119.
- Crisafulli A, Romeo A, Floccari F, Aloisi E, Atteritano M, Cincotta M, Aloisi C, Pizzoleo MA, Ruello A, Artemisia A, Valenti A, Frisina N, Teti D, Buemi M. Osteoprotegerin and bone mineral density in hemodiafiltration patients. *Ren Fail*. 2005;27(5):531-539.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):380-387.
- de Brito Junior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP: Polimorfismos in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2004;75(8):1090-1095.
- Daroszewska A, Hocking LJ, McGuigan FE, Langdahl B, Stone MD, Cundy T, Nicholson GC, Fraser WD, Ralston SH. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J Bone Miner Res*. 2004 Sep;19(9):1506-1511.
- De Rossi SS, Glick M. Dental considerations for the patient with renal disease receiving hemodialysis. *J Am Dent Assoc*. 1996; 127(2):211-219.
- Ebisu S, Noiri Y. Oral Biofilms and bone resorption *Clin Calcium*. 2007 Feb;17(2):179-184.
- Eigner TL, Jastack JT, Bennet WM. Achieving oral health in patients with renal failure and renal transplants. *J. Am Dent Assoc*. 1986 Oct; 113 (4): 612-616.
- Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Apr;20(4):851-852.
- Foley RN. Infections and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006 Jul;13(3):205-208.

- Garlet GP, Martins JR W, Fonseca BAL Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-679.
- Goldfarb-Rumyantzev AS, Cheung AK, Habib AN, Wang BJ, Lin SJ, Baird BC, Naiman N, Cannon-Albright L. A population-based assessment of the familial component of chronic kidney disease mortality. *Am J Nephrol*. 2006; 26(2): 142-148.
- Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *J Amer Dent Assoc*. 1964 Jan; 68: 7-13.
- Grzegorzewska AE, Mlot M. Using the ratio of serum osteoprotegerin ligand to osteoprotegerin to evaluate renal osteodystrophy in dialysis patients. *Adv Perit Dial*. 2005;21:188-93.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.. *Endocrinology*. 1999 Oct;140(10):4382-4389.
- Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1132-1136.
- Jassal SK, von Muhlen D, Barrett-Connor E. Measures of renal function, BMD, bone loss, and osteoporotic fracture in older adults: the Rancho Bernardo study. *J Bone Miner Res*. 2007 Feb;22(2):203-210.
- Khan S. Secondary Hyperparathyroidism Is Associated with Higher Cost of Care among Chronic Kidney Disease Patients with Cardiovascular Comorbidities. *Nephron Clin Pract*. 2007;105(4):c159-164.
- Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J*. 2001 Mar: 46(1): 2–12.
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Apr 14; 1445(1):134-141.

- Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Chiba I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 27;315(1):107-112.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG JR, Higginbottom FI; Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan; 24(1): 72-77.
- Kshirsagar AV, Moss KL, Elter JR, Beck JD, Offenbacher S, Falk RJ. Periodontal disease is associated with renal insufficiency in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Am J Kidney Dis*. 2005 Apr;45(4):650-7.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-176.
- Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polimorfismosin the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2002 Jul;17(7):1245-1255.
- Lee S-K, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999 Aug;140(8):3552-3561.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999 Mar 16;130(6):461-470.
- Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. i. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963 dec;21:533-51.
- Lynch MA, Brightman VJ, Greenberg MS. *Burket's Oral Medicine - Diagnosis and Treatment*. 9th ed, Philadelphia, J.B.Lippincott Co. 1994; 487- 509.

- Marakoglu I, Gursoy UK, Demirer S, Sezer H: Periodontal status of chronic renal failure patients receiving hemodialysis. *Yonsei Med J* 2003;44(4):648-652.
- Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):322-9 Comment in: *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):284, 286.
- Moe SM, Drueke T, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2007 Jan;14(1):3-12.
- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004 Feb;83(2):166-169.
- Montalban C, Garcia-Unzueta MT, Defrancisco ALM, Amado JA. Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: relationship with serum PTH and bone remodeling markers. *Horm Metab Res.* 1999 Jan;31(1):14-17.
- Morinaga, T; Nakagawa, N; Yasuda, H; Tsuda, E; Higashio, K . Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerina osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem.* 1998 Jun 15;254(3):685-691.
- Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y: Vitamin D receptor gene polymorfismos affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32:464-469.
- Naugle K, Darby ML, Bauman DB, Lineberger LT, Powers R: The oral health status of individuals on renal dialysis. *Ann. Periodontol.* 1998;3:197-205.
- Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986 Aug;78(2):355-360.
- Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002;47(8):400-406.

- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin Inhibits Artery Calcification Induced by Warfarin and by Vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1610-1616.
- Proctor R, Kumar N, A. Stein, D. Moles, and S. Porter. Oral and Dental Aspects of Chronic Renal Failure. *J Dent Res.* 2005 Mar;84(3):199-208. Review.
- Rahmati MA, Craig RG, Homel P, Kaysen GA, Levin NW: Serum Markers of Periodontal Disease Status and Inflammation in Hemodialysis Patients *Am J Kidney Dis.* 2002;40(5):983-989.
- Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Muller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2006 Aug 15;15(16):2446-2456.
- Rose BD, Bulack RM. *Manual of clinical problems in nephrology.* Boston, Toronto: Little, Brown CO 1988: 371.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17 beta-Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- α . *Endocrinology.* 2001 Jun;142(6):2205-2212.
- Schenkein HA, Van Dyke TE. Early-onset periodontitis: Systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol 2000.* 1994 Oct;6:7-25.
- Schoolwerth AC, Engलगau MM, Hostetter TH, Rufo KH, Chianchiano D, McClellan WM, Warnock DG, Vinicor F. Links Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis.* 2006 Apr;3(2):A57.
- Shalhoub V, Faust J, Boyle W J, et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem.* 1999 Feb 1;72(2):251-261.
- Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1964; 22: 121-135.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen Q, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R,

Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay , Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-319.

Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006. Available: <http://www.sbn.org.br/Censo/2006/censoSBN2006.ppt#12>

Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D, Ishihara Y, Suzuki M, Noguchi T, Sakaki Y, Yamaguchi A, Kojima T. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorfismosin aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006 Oct;41(5):397-404.

Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch, Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegerin gene polymorfismosin men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug;89(8):3764-3768.

Souza CM, Braosi APR, Luczyszyn SM, Ávila AR, De Brito Junior R, Ignácio SA, Probst CM, Riella MC, Sotomaior VS, Pecoits-Filho R, Trevilatto PC. Analysis of the Association between Polimorfismosin the Gene of the Vitamin D Receptor and the Susceptibility to Chronic Kidney Disease and Periodontitis. *Blood Purif*. *Submitted*.

Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger O. Novel approaches in an integrated therapy of inflammatory-associated wasting in end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2004 Nov-Dec;17(6):505-515.

Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27091-27096.

Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun;18(1):6-9.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003 May;30(5):438-442.

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD. Association study of candidate genes for the

- prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Aug ;50 (8):2497-2507.
- Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas.* 2006 Mar 20;53(4):386-395.
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone.* 2004 Sep;35(3):629-635.
- Wittersheim E, Mesquita M, Demulder A, Guns M, Louis O, Melot C, Dratwa M, Bergmann P. OPG, RANK-L, bone metabolism, and BMD in patients on peritoneal dialysis and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2006 Jun;39(6):617-622.
- Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006 Mar;77(3):426-436.
- Wyatt CM, Winston J. Renal disease in patients with HIV. *Curr Infect Dis Rep.* 2006 Jan;8(1):76-81.
- Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int.* 2002; 71:26–35.
- Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M. Double mutations in *klotho* and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology.* 2002 Dec;143(12):4711-4717.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1329-1337.

Tabela 1. Características básicas dos grupos estudados.

	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=50)	Grupo 3 (n=50)	Grupo 4 (n=64)
Grupo Étnico n (%)				
Branços	47 (78,3)	38 (76)	35 (70)	44 (68,8)
Negros	4 (6,7)	11 (22)	13 (26)	5 (7,8)
Mulatos	9 (15,0)	1 (2)	2 (4)	15 (23,4)
Idade	37,8±9,6 (20-70)	40,8±9,4 (20-61)	45,2±12,9 (23-74)	54,5±12,2 (26-77)
Sexo n (%)				
Mulheres	43 (71,7)	33 (66)	16 (34)	23 (35,9)
Homens	17 (28,3)	17 (34)	34 (66)	41 (64,1)

Grupo 1: pacientes saudáveis. Grupo 2: sem DRC e com P. Grupo 3: com DRC e sem P. Grupo 4: apresentam DRC e P.

Tabela 2. Distribuição dos parâmetros clínicos em pacientes com DRC.

	Sem P ^a (n=50)	Com P (n=64)
<i>Causa Principal da DRC</i> ^b n (%)		
Glomerulonefrite Crônica	19 (38)	21 (32,8)
Nefropatia hipertensiva	14 (28)	10 (15,9)
Nefropatia diabética	7 (14)	14 (22,2)
Outros/ desconhecido	10 (20)	19 (30,2)
<i>Duração do Tratamento de HD</i> ^c <i>(meses)</i> [†]	47,8±48,0	47,2±43,3
<i>Condição Médica Geral</i> n (%)		
Diabetes	7 (14)	17 (26,9)
Hepatite	11 (22)	17 (26,9)
DCV ^d	10 (20)	17 (26,5)
Hipertensão	33 (66)	54 (85,7)
<i>Medicação Administrada</i> n (%)		
Antihipertensivos	35 (70)	50 (78,1)
Diuréticos	10 (2)	23 (36,5)
Carbonato de cálcio	34 (68)	47 (73,4)
Vitamina D (calcitriol)	9 (18)	7 (11,1)
Agentes antiplaquetários	3 (6)	5 (7,9)
Outros	41 (82)	51 (80,9)
<i>Hábitos</i> n (%)		
Fumo	11 (22)	16 (25,3)

^aDoença periodontal; ^bDoença renal crônica; ^cHemodiálise; ^dDoença cardiovascular;

[†]Média±Desvio padrão.

Tabela 3. Estado periodontal da população estudada.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	(n=60)	(n=50)	(n=50)	(n=64)
<i>Índice Gengival</i> [†]	0,2±0,4	1,5±0,9	0,5±0,6	1,7±0,7
<i>Índice de Placa</i> [†]	0,3±0,4	1,3±1,0	0,5±0,8	1,0±0,9
<i>Índice de Cálculo</i> [†]	0,2±0,2	1,0±0,9	0,3±0,5	0,7±0,9
<i>PS</i> ^a (mm) [†]	1,5±2,4	4,6±1,0	2,0±2,0	3,6±1,1
<i>NIC</i> ^b (mm) [†]	2,2±2,6	6,1±0,9	2,6±2,7	5,3±1,3
<i>Mobilidade (S/N)</i>	0/60	21/29	0/50	32/32

^aProfundidade de sondagem; ^bNível de inserção clínica; [†]Média±Desvio padrão.

Table 4. Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo no gene da OPG.

SNP (-223) n (%)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=50)	Grupo 3 (n=50)	Grupo 4 (n=64)	Qui- quadrado
Genótipos					
T T	47 (78,3)	41 (82,0)	43 (86,0)	52 (81,3)	$\chi^2=3,86$ $p=0,69$
T C	5 (8,3)	6 (12,0)	3 (6,0)	4 (6,2)	
C C	8 (13,4)	3 (6,0)	4 (8)	8 (12,5)	
Alelos					
T	99 (82,5)	88 (88,0)	89 (89,0)	108 (84,4)	$\chi^2=2,50$ $p=0,47$
C	21 (17,5)	12 (12,0)	11 (11,0)	20 (15,6)	

cgtgtgccagccctcccaccgctgggtcccggctgccaggaggctggccgctggcggaaggggcccggga
 aacctcagagccccgcggagacagcagccgcctgttcctcagcccgggtggcttttttcccctgctctcccag
gggacagacaccacgcgccccacccctcacgccccacctccctgggggatCCTTTCCGCCCCAGC
 CCTGAAAGC*gttaa***T/C**CCTGGAGCTTTCTGCACACCCCCGACCGCTCCCG
 CCCAAGCTTCCTAAAAAAGAAAGGTGCAAAGTTTGGTCCAGGATAGAAAAA
 TGACTGATCAAAGGCAGGCGATACTTCCTGTTGCCGGGACGCTATATATAA
 CGTGATGAGCGCACGGGCTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTCGCCCAGC
 CGCCGCCTCCAAGCCCCTGAGGTTTCCGGGGACCACA*atgaacaaagtgtgtgc
tgcgcgctcgtggttaagtccctgggccagccgacgggtgccggcgccctggggaggctgctgccacctggc
 tcccaacctcccagcggaccggcggggagaaggctccactcgtccctcccaggagaggctggggtagg
 ctggagcaggaaaccgctttcaagttatgccatgcttcccctagggt

Figura 1. Sequência do gene da OPG humana (AB008821). As bases sublinhadas representam os *primers* para amplificação do fragmento. Letras maiúsculas indicam a região 5' UTR. (*) representa o início do primeiro éxon. Em itálico estão representados os nucleotídeos que compõem o sítio de restrição da enzima *HincII*. Em negrito estão as bases do polimorfismo (T/C).