ISABELLA MARIA PORTO DE ARAUJO

**Doença periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do
Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos**

São Paulo

2014

ISABELLA MARIA PORTO DE ARAUJO

**Doença periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do
Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor pelo Programa de Pós-
graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Titular Francisco Emílio
Pustiglioni

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Araujo, Isabella Maria Porto de.

Doença periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos / Isabella Maria Porto de Araujo ; orientador Francisco Emílio Pustiglioni. -- São Paulo, 2014.

93 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Periodontite. 2. Hormônio do crescimento. 3. Nanismo. 4. Microbiologia. 5. Imunologia. I. Pustiglioni, Francisco Emílio. II. Título.

Araujo IMP. Doença periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus que, com sua Luz e presença Divina, me iluminou nesta caminhada e me guiou para que eu pudesse concretizar o meu grande sonho.

Aos meus queridos pais Nonato e Laura,

Exemplos de caráter, dignidade, moral e ética. Sempre me incentivaram e me mostraram a importância da busca incessante do conhecimento, me apoiaram e participaram intensamente deste caminho, na busca do meu grande sonho. Juntos, compartilhamos todos os momentos percorridos até aqui. A minha gratidão é eterna. Com certeza, esta vitória é nossa!!! Amo vocês mais que tudo!!!

Aos meus irmãos Alexandre e Vanessa,

Irmãos, amigos e companheiros, em todos os momentos. Agradeço pela amizade, carinho e cumplicidade. Ter irmãos como vocês é uma das minhas maiores felicidades. Muito obrigada.

Ao meu Amor Vinicius,

Por ser tão amoroso, amigo e companheiro. Muito obrigada por me proporcionar tantos momentos de alegria e por estar tão disposto a me ajudar. Sua presença foi fundamental para mim. Muito obrigada por tudo. Te amo muito!

À minha avó de coração Lúcia,

Pessoa iluminada que faz parte da minha vida. Agradeço pelo Amor tão verdadeiro e pelo carinho sempre demonstrado.

Aos meus sobrinhos Leonardo e Davi

Por regarem a minha vida de alegria e felicidade. Amo vocês.

Aos meus avós Waldyr (*in memoriam*), Margarida, Francisco (*in memoriam*) e Diva,

Por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso. Vocês sempre serão o meu exemplo de que a maior sabedoria está em perdoar e amar ao próximo.

À minha madrinha Dora e ao meu tio Edson

Por serem pessoas tão especiais. Muito obrigada por torcerem tanto por mim e acreditarem nas minhas escolhas.

Aos meus padrinhos Célio e Clara,

Por sempre me demonstrarem tanto carinho e torcerem pela minha conquista.

Aos meus cunhados Roseane e Rafael

Pela amizade e união. Com vocês, formamos uma só família.

A Cida

Por ter sido um apoio muito importante para mim durante todos estes anos aqui em São Paulo. Por se preocupar tanto comigo, por cuidar da minha casa e do meu “filho cão” quando eu tinha que estar em Itabaianinha.

À minha família: tios e primos

Nela, o amor que encontro tem raízes e dá frutos. O elo que nos une mostra como a família é importante e a maior grandeza que Deus pode nos dar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni,

Por me dar a oportunidade de ser sua orientada, desde o curso do Mestrado. Agradeço muito pelos brilhantes ensinamentos e por acreditar, desde o início, que este projeto poderia ser realizado. Muito obrigada por ter confiado em mim e, acima de tudo, por ter sido esse Mestre tão disposto a me ajudar e a colaborar com o andamento e execução deste trabalho. Com certeza, o senhor foi fundamental para esta conquista. Esta vitória é nossa. Muito obrigada!

Ao Prof. Associado Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira,

Exemplo de profissionalismo, ética e humanidade. Com o senhor aprendi muito além do que lemos nos livros e artigos. Muito obrigada por ter aberto as portas para que eu pudesse ingressar neste trabalho e por ter facilitado ao máximo a execução do mesmo. As palavras sempre serão muito poucas para retribuir a minha gratidão.

A Luiz Oliveira Neto,

Por estar sempre comigo, fazendo chuva ou sol, em todas as etapas deste trabalho em Itabaianinha. O nosso convívio durante estes anos mostrou o quão é importante uma verdadeira amizade para que o trabalho possa ocorrer da melhor maneira possível. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Roberto Salvatori,

Por estar tão disposto a colaborar com o sucesso deste trabalho. O seu brilhantismo nos ajudou muito.

Ao Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito,

Por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Agradeço muito por ter colaborado com idéias que engrandeceram este trabalho e por ter me ajudado quando eu mais precisei. O seu apoio foi fundamental.

Ao Prof. Associado Cláudio Mendes Pannuti,

Por sempre estar disposto a nos ajudar e colaborar com a melhoria do trabalho.
Muito obrigada por ser sempre tão acessível.

Às Profas. Marinella Holzhausen e Luciana Saraiva

Por me ajudarem tanto nas etapas das análises imunológica e microbiológica.
Agradeço pelos ensinamentos e pela grande ajuda!

À Profa. Márcia Mayer

Por ter ajudado a delinear este trabalho. Muito obrigada pelas sugestões.

A Priscila Corraini,

Minha parceira desde o início deste estudo, me ajudando a delineá-lo. Sua contribuição foi muito importante.

Aos Professores da disciplina de Periodontia, Giorgio de Micheli, Cesário Antônio Duarte, Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, José Hildebrando Todescan, Marco Georgetti, Marina Conde, João Batista César Neto

Que me ensinaram e enriqueceram meus conhecimentos na Periodontia.

À Prof^a. Cintia Helena Coury Saraceni,

Por ter me orientado e incentivado na Iniciação Científica e por sempre ter acreditado no meu sonho.

Aos Prof^{es}. Fernando Neves Nogueira e Edgard Michel Crosato,

Muito obrigada pelas sugestões durante o andamento deste trabalho.

Aos Profs. Fábio Daumas e Fausto Medeiros Mendes,

Pelas sugestões, durante o meu exame de qualificação, que engrandeceram o trabalho

Aos meus amigos Rodrigo Nahas e Mariana Ragghianti,

Pela grande amizade e parceria durante todos estes anos de pós-graduação.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação Cissa, Cris Yorioka, Valéria, Cássia, Mariana Ragghianti, Sabrina, Carol, Juliana, Luciana, Osmar, Márcio Seto, Rodrigo Santos, Leandro, Verônica, Daniele, Vanessa, Ana Karina, Silvia, Rogéria, Dida, Caio, Mariana, Ana Paula

Sinto-me feliz em ter tido a companhia de vocês durante todo este tempo.

Aos amigos Ana Carla, Paulo Kawakami, Sabrina, Karen, Ana Flávia, Fernanda, Ignez, Marta, Marian e Cris

Por terem entendido a minha ausência, em vários momentos, e por torcerem tanto por mim.

Aos “pequenos” de Itabaianinha

Apesar de pequenos, são grandes em essência. Com vocês aprendi que, apesar das dificuldades, a vida é feita de alegrias e superação. Muito obrigada por vocês serem essas pessoas tão maravilhosas e por estarem sempre tão dispostos a participar desta pesquisa.

À prefeitura de Itabaianinha

Por ter nos ajudado com a adequação da rede de energia elétrica da Associação dos Anões e com a segurança da casa durante todos estes anos.

A Ivanilde Souza,

Por me dar assistência neste projeto.

A Silvino,

Muito obrigada por sempre tornar viável as minhas idas e vindas a Itabaianinha, transportando o consultório odontológico portátil e todo o material necessário para a realização deste projeto.

A Roberto, funcionário da White Martins em Sergipe,

Por ter me ajudado tanto, fornecendo gelo seco para que eu armazenasse as amostras durante as coletas e no transporte das mesmas para São Paulo. Mesmo quando a empresa estava fechada, eu conseguia gelo seco, graças à sua bondade e compreensão.

Às técnicas de laboratório Rosângela e Meyre

Por terem ajudado nas fases laboratoriais deste trabalho, esclarecendo as dúvidas e ajudando-nos para a melhor execução das mesmas.

Às amigas e funcionárias da Pós-Graduação Alessandra, Kátia e Veridiana

Muito obrigada pela amizade, ao longo destes anos, e pela assistência que sempre me deram durante todo este tempo.

Às amigas e funcionárias da biblioteca Glauci e Vânia

Pela amizade e por me ajudarem tanto, ao longo dos cursos de Mestrado e Doutorado. O apoio de vocês foi muito importante.

Às funcionárias da Periodontia Márcia e Marília, bem como às funcionárias do Departamento de Estomatologia, Nina, Cecília e Regina

Agradeço pela disposição em sempre me ajudar no que preciso.

Aos amigos, funcionários da FOU SP Rosivaldo, Nancy, Letícia, Fernando, Clóvis, Maria do Carmo, Silvana, Vera e Renato

Após todos estes anos na FOU SP, uma das minhas grandes felicidades foi ter feito amigos como vocês. Muito obrigada por sempre terem me ajudado tanto.

Aos funcionários da Informática Marinho, Júnior e Fábio

Agradeço por todas as vezes que vocês me receberam e me deram assistência no âmbito da informática.

À FAPESP,

Pelo auxílio financeiro à pesquisa (protocolo nº. 2011/24005-6).

À CAPES,

Pela bolsa de Doutorado.

*"O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se
chegar a um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis."*

José de Alencar

RESUMO

Araujo IMP. Doença periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Indivíduos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento (IGHD), homozigotos para a mutação c.57+1G>A no gene do receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), apresentam maior chance de apresentarem perda de inserção periodontal devido a possível efeito direto da IGHD sobre os tecidos periodontais e/ou a repercussões locais ou sistêmicas da IGHD sobre a resposta imune. Este estudo teve como objetivos avaliar as repercussões locais e sistêmicas da IGHD sobre a resposta imune e comparar os níveis dos patógenos periodontais. Material e Métodos: Foi composto por uma amostra de 19 indivíduos com IGHD e 19 indivíduos no grupo controle, pareados por idade, gênero, condição sócio-econômica, tabagismo e diabetes. Todos foram submetidos a exame periodontal completo, em 6 sítios por dente, e entrevistados por meio de um questionário estruturado. Foi realizada coleta de biofilme subgengival (em sítios rasos e profundos, pareados pela PCS) para verificar os níveis dos microorganismos. Além disso, foram realizadas coletas do fluido gengival (dos mesmos sítios) e do sangue, de ambos os grupos, com a finalidade de analisar o perfil das citocinas inflamatórias. Resultados: Indivíduos com IGHD apresentaram maior quantidade de MMP-8 e CRP ($p=0,026$ e $0,002$) no fluido gengival coletado dos sítios profundos, maior quantidade de IL-17 ($p=0,02$) no soro e mesmos níveis dos patógenos periodontais, em comparação com os controles ($p>0,05$). Conclusões: Mesmo com um perfil microbiológico semelhante, indivíduos com a IGHD apresentam alterações imunológicas moderadas (aumento de Interleucina 17 no soro e de metaloproteinase-8 e Proteína C-Reativa no fluido gengival coletado de sítios profundos), comparados aos controles.

Palavras-chave: Periodontite. Hormônio do Crescimento. Nanismo. Microbiologia. Imunologia.

ABSTRACT

Araujo IMP. Periodontal disease in adults with isolated growth hormone deficiency: clinical, microbiological and immunological aspects [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD) subjects, homozygous to a mutation c.57+1G>A in the growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) gene, have a greater chance of having periodontal attachment loss (PAL) due to a possible direct effect of IGHD on the periodontal tissues and/or local and systemic effects of IGHD on immune response. This aim of this study was evaluate local and systemic effects of IGHD on immune response and compare periodontal pathogens levels. Material and Methods: The sample was composed of 19 IGHD individuals and 19 controls, matched by age, gender, socio-economic condition, smoking and diabetes. Participants were submitted to a clinical full-mouth periodontal examination of six sites per tooth and were interviewed using a structured questionnaire. Subgingival biofilm was collected (in shallow and deep sites matched by probing clinical depth) to check the periodontal pathogens levels. Furthermore, gingival crevicular fluid (same sites) and blood samples were also collected from both groups to analyze inflammatory cytokines profile. Results: IGHD subjects had significantly higher amounts of MMP-8 and CRP ($p=0.026$ e 0.002) in the gingival crevicular fluid collected from deep sites, higher amounts of IL-17 ($p=0.02$) in serum, and same levels of periodontal pathogens, comparing to the control group ($p>0.05$). Conclusions: Despite the same microorganism profile, IGHD subjects had moderate immunological alterations (increased serum Interleukin 17 and metalloproteinase 8 and C - reactive protein in deep sites gingival fluid), comparing to controls.

Keywords: Periodontitis. Growth Hormone. Dwarfism. Microbiology. Immunology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Localização geográfica do município de Itabaianinha em relação ao estado brasileiro Sergipe, bem como à sua capital Aracaju 33
- Figura 4.2 - Imagem representativa do município Itabaianinha..... 34
- Figura 4.3 - Fluxograma representativo da obtenção dos indivíduos do grupo com IGHD 35
- Figura 4.4- Associação dos Anões, local onde foram realizadas as coletas de dados 35
- Figura 4.5 - Consultório Odontológico Portátil instalado na Associação dos Anões, para que os dados clínicos fossem coletados..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Valores de glicose plasmática (mg/dL) para diagnóstico de Diabetes Mellitus e seus estágios pré-clínicos	37
Tabela 5.1 - Características biológicas, comportamentais e clínicas periodontais, dos indivíduos com IGHD e dos controles	47
Tabela 5.2 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis dos patógenos periodontais (com transformação logarítmica), entre os indivíduos com IGHD e os controles.	48
Tabela 5.3 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas no fluido gengival, dos indivíduos com IGHD e dos controles.....	49
Tabela 5.4 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas no soro, dos indivíduos com IGHD e dos controles..	50
Tabela 5.5 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas e dos patógenos periodontais, nos sítios rasos e profundos dos indivíduos com IGHD.....	51
Tabela 5.6 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas e dos patógenos periodontais, nos sítios rasos e profundos dos indivíduos do grupo controle..	52
Tabela 5.7 - Correlação da PCS, do sítio de coleta, com as citocinas do fluido e com os patógenos periodontais, nos indivíduos com IGHD.	53
Tabela 5.8 - Correlação da PCS, do sítio de coleta, com as citocinas do fluido e com os patógenos periodontais, nos indivíduos do grupo controle	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
<	Menor
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem
<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
CCI	Coeficiente de correlação intra-classe
CRP	Proteína C-reativa
FG	Fluio gengival
g	Grama
GAG→TAG	Mutação onde a guanina foi substituída pela tiamina
GCP	Glicemia Capilar Plasmática
GH	<i>Growth Hormone</i> leia-se Hormônio do Crescimento
GHBP	<i>Growth Hormone Binding Protein</i> leia-se Proteína de Ligação do Hormônio do Crescimento
GHD	<i>Growth Hormone Deficiency</i> leia-se Deficiência do Hormônio do Crescimento
GHR	<i>Growth Hormone Receptor</i> leia-se Receptor do Hormônio do Crescimento
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i> leia-se Hormônio Receptor do Hormônio do Crescimento
GHRH-R	<i>Growth Hormone Releasing Hormone Receptor</i> leia-se Receptor do Hormônio liberador do Hormônio do Crescimento
h	Horas
IC	Intervalo de Confiança
IGF-I	<i>Insulin Like Growth Factor - I</i> leia-se Fator de Crescimento Insulina-Símile - I
IGHD	<i>Isolated Growth Hormone Deficiency</i> leia-se Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento
IL	Interleucina
JEC	Junção Esmalte-Cimento
kg	Kilograma

IVS1+1G→A	Mutação no ítron 1 onde a guanina foi substituída pela adenina
LEC	Linha Esmalte-Cimento
m	Metro
MG	Margem Gengival
mg	Miligrama
mg/dL	Miligramas por decilitro
MGHD	<i>Multiple Growth Hormone Deficiency</i> leia-se Deficiência associada a déficit de Múltiplos Hormônios Hipofisários
Mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinases de matriz
n	Número de indivíduos
NCI	Nível Clínico de Inserção
ng	Nanogramas
nº	Número
OHB	Orientação de Higiene Bucal
OR	<i>Odds Ratio</i> leia-se Razão de Chances
<i>p</i>	Nível descritivo do teste
PCS	Profundidade Clínica de Sondagem
PCI	Perda Clínica de Inserção Periodontal
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>T.d</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T.f</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 GH e GHD	22
2.2 GH na formação dos tecidos periodontais	24
2.3 Doença periodontal: aspectos microbiológicos e imunológicos	25
2.4 Fluido gengival como ferramenta auxiliar de diagnóstico periodontal.....	28
2.5 Níveis séricos de biomarcadores inflamatórios como ferramenta auxiliar de diagnóstico periodontal	29
2.6 Associação da DGH com a resposta imunológica	29
2.7 IGHD X Imunologia	30
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 População e desenho do estudo.....	33
4.2 Considerações Éticas	36
4.3 Dados demográficos, antropométricos e glicêmicos	36
4.4 Dados Clínicos.....	37
4.5 Coleta do fluido gengival	40
4.6 Coleta do biofilme subgengival.....	40
4.7 Coleta sangüínea	41
4.8 Análise microbiológica	41
4.9 Análise do fluido gengival e do soro	42
4.10 Dosagem de proteínas do fluido gengival	44
4.11 Análise Estatística	44
5 RESULTADOS	46
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

O Hormônio do Crescimento (GH) tem importantes funções imunoregulatórias (Clark, 1997) que podem influenciar a resposta inflamatória crônica. O aumento da ativação dos monócitos (Serri et al., 1999) associado a elevadas concentrações de citocinas inflamatórias circulantes (Serri et al., 1999; Sesmilo et al., 2000) têm sido reportados em adultos com Deficiência do Hormônio do Crescimento (GHD). A presença do receptor do GH (GHR) em diferentes subpopulações de linfócitos e neutrófilos sugere que, em adição ao efeito endócrino, este hormônio apresenta uma função imune (Rapaport et al., 1995).

Indivíduos com GHD apresentam aumento na produção de interleucina-6 (IL-6) e de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelos monócitos, além de aumento nas concentrações séricas de proteína C-reativa (CRP), TNF- α e IL-6 (Serri et al., 1999; Sesmilo et al., 2001), MMP-9 (Randeva et al., 2004). Este aumento de CRP e IL-6 nos níveis séricos também foi observado em estudo observacional transversal (Leonsson et al., 2003). O tratamento destes indivíduos com GH mostra redução na produção de IL-6 pelos monócitos (Serri et al., 1999), nos níveis séricos de TNF- α (Andiran; Yordam, 2007), CRP (Sesmilo et al., 2000; Deepak et al., 2010), IL-6 (Sesmilo et al., 2000) e MMP-9 (Randeva et al., 2004).

A doença periodontal, por sua vez, é compreendida como uma doença inflamatória crônica, resultante da interação entre a resposta imune do hospedeiro e a presença de espécies bacterianas patogênicas no biofilme dental (Page; Kornman, 1997). A microbiota subgengival apresenta, predominantemente, bactérias gram-negativas, anaeróbias ou facultativas, que estão associadas às formas graves da doença periodontal. Dentre elas estão *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola* (Haffajee; Socransky, 1992; Socransky et al., 1998; Socransky et al., 2002; López, 2000).

O início e a progressão da doença periodontal não são devidos, somente, à presença de microorganismos específicos. É necessário que haja um desequilíbrio entre os níveis e proporções de patógenos periodontais e espécies benéficas em

diferentes sítios da boca (Socransky; Haffajee, 2005), correlacionado à resposta imune do hospedeiro (Taubman; Kawai, 2001).

Em uma população de baixa condição sócio-econômica presente no Nordeste do Brasil, foi identificada uma numerosa família com mutação (IVS1 + 1G→A) no gene do receptor do hormônio liberador do GH (GHRH-R), que bloqueia completamente a expressão do GHRH-R. Todos estes sujeitos têm níveis muito baixos de GH e de fator de crescimento Insulina Símile - I (IGF-1) ao nascimento, resultando em severa baixa estatura (Aguiar-Oliveira et al., 1999; Salvatori et al., 1999), com face de boneca, voz de timbre agudo e obesidade abdominal (Aguiar-Oliveira et al., 2010). A grande maioria dos indivíduos adultos nunca foi tratada com GH.

Estes indivíduos têm o diagnóstico da Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento (IGHD) (Salvatori et al., 1999), que é uma doença genética rara (de 1/3.480 a 1/10.000 nascidos vivos) (Vimpani et al., 1977; Lindsay et al., 1994). Em Itabaianinha, a frequência fenotípica da IGHD chega a 1/279. O fenótipo apresenta estatura final que varia de 117 a 137cm em homens e de 107 a 126cm em mulheres (Souza, 1997). Estudos sobre longevidade e tamanho dos órgãos abdominais foram realizados nestes indivíduos, sugerindo que existe uma disfunção imune associada à deficiência isolada e severa do GH (Aguiar-Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2008)

Recentemente, o primeiro trabalho clínico que avaliou doença periodontal em adultos com IGHD (Itabaianinha) mostrou que eles possuem maior chance de apresentar Periodontite em relação aos controles pareados (Britto et al., 2011). Cogitou-se da possibilidade de haver um desequilíbrio entre os níveis e proporções de microorganismos presentes na cavidade bucal, associado a uma alteração da resposta imunológica destes indivíduos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GH e GHD

O GH é produzido no lobo anterior da hipófise e está sob controle dos peptídeos hipotalâmicos: Hormônio Receptor do GH (GHRH), Somatostatina e, em menor intensidade, da grelina. Tem estrutura molecular de 191 aminoácidos e peso molecular de 22.000 daltons. Encontramos de 3 a 5 mg de GH em uma hipófise normal, que secreta diariamente 500 a 875 ng de GH (Thorner et al., 1992; Greenspan; Strewlwer, 1997; Fauci et al., 1998).

Após ser produzido e liberado pelos somatotrofos hipofisários, cerca de metade do GH circulante na corrente sanguínea liga-se a uma proteína de alta afinidade de ligação, a GHBP, cuja estrutura representa a parte extracelular do receptor do GH (Greenspan; Strewlwer, 1997; Boguszewski, 2001).

As ações do GH são mediadas tanto diretamente através da ativação do seu próprio receptor, quanto, indiretamente, pelo estímulo na produção do Fator-1 de Crescimento semelhante à insulina (IGF-I). O receptor do GH (GHR) tem sido demonstrado em vários tecidos como: músculo, tecido adiposo, rim, osso, fígado, cérebro, coração e pâncreas (Kargi; Merriam, 2013). O GHR também está presente nos tecidos do periodonto (Waters et al., 1991).

A GHD pode ser classificada em esporádica ou familiar (Salvatori et al., 2001). A GHD familiar pode ser isolada (IGHD) ou associada a deficiência de múltiplos hormônios hipofisários (MGHD). A IGHD é pouco freqüente, ocorrendo em cerca de 1:3.480 a 1:10.000 nascidos vivos, sendo que três diferentes tipos de herança são descritas (Philips et al., 1981).

- Tipo I – Autossômica recessiva:
 - Tipo Ia - Autossômica recessiva com níveis séricos ausentes de GH
 - Tipo Ib - Autossômica recessiva com níveis séricos bastante reduzidos de GH (mais freqüente)
- Tipo II - Autossômica dominante
- Tipo III - Ligada ao cromossomo

A primeira mutação no gene do receptor do GHRH (GHRH-R) levando a IGHD tipo Ib foi descrita em três famílias do subcontinente indiano, das quais, a mais conhecida é a dos “Anões de Sindh” (Maheshawari et al., 1998). Nesta família encontrou-se uma mutação GAG→TAG no códon 72, correspondente ao aminoácido residual 50 na proteína madura do GHRH-R. Esta mutação anula o sítio de ligação para o GHRH, o que leva a hipoplasia pituitária e deficiência isolada do GH.

O segundo tipo de mutação do GHRH-R foi descrito em 105 indivíduos do povoado de Carretéis, localizado no município do estado brasileiro Sergipe. Trata-se de uma mutação homozigótica do tipo “splice” na posição 5’ no início do íntron 1 no gene do receptor do GHRH, com substituição de uma guanina por uma adenina (IVS+1 G→A). A herança é autossômica recessiva (tipo Ib). Essa mutação impede a síntese de RNA mensageiro (mRNA) do GHRH-R, resultando em um receptor de GHRH completamente truncado, o que conduz a uma deficiência isolada e grave de GH (Hayashida et al., 2000; Salvatori et al., 1999; 2001; 2002). Os homozigotos para esta mutação têm níveis muito baixos de GH e IGF-I, massa muscular diminuída, aumento de percentual de massa gorda, relação cintura/quadril aumentada, aumento dos níveis de LDL colesterol e de Proteína C-Reativa de alta afinidade, aumento de pressão sanguínea sistólica, nenhuma resistência à insulina ou evidência de aterosclerose prematura (Barretto et al., 1999; Oliveira et al., 2006).

O alto número de casamentos consanguíneos na comunidade propiciou a propagação da mutação. O grande número de casos de IGHD presentes no mesmo local, sem qualquer outra alteração hormonal, vem possibilitando ampliar o conhecimento sobre as consequências dessa deficiência, pois se trata do grupamento familiar maior e mais importante já descrito, constituindo uma população ideal para definir, com precisão, as consequências da IGHD não tratada em adultos (Souza, 2004)

2.2 GH na formação dos tecidos periodontais

Foi proposto que GHBP e GHR estão envolvidos na transdução de sinais intracelulares durante o desenvolvimento dentário embrionário, conforme tem sido proposto em tecidos de animais (Lobie et al., 1991; Lobie et al., 1994). A influência local do GH na odontogênese é suportada por estudos usando imunohistoquímica com anticorpo específico monoclonal, que mostram a expressão do GHR em células odontogênicas de incisivos e molares adultos de ratos (Waters et al., 1991; Zhang et al., 1992).

O GH é importante por aumentar a proliferação celular no interior do epitélio dentário, papila dentária e da bainha epitelial de Hertwig, antes da citodiferenciação dos odontoblastos (Young et al., 1992; Young et al., 1995) e da proliferação do mesênquima odontogênico, em ratos (Young et al., 1993).

Nos humanos, atua nos fibroblastos mesenquimais durante o desenvolvimento fetal tardio e pós-natal, promovendo a formação de tecidos como o osso, cartilagem, rim, pulmão, pele, cabelo e órgãos reprodutivos (Hogan, 1996; Waters, 1999).

Ainda nos humanos, o GH pode afetar, direta ou indiretamente, a proliferação das células que formam o ligamento periodontal (Yonemura et al., 1992). Isto é comprovado pela detecção do GHR em tecidos do periodonto humano, sugerindo que ele influencia a diferenciação e função celular durante a formação da raiz e estabelecimento do ligamento periodontal (Waters et al., 1991).

Este fenômeno também foi observado através da investigação da distribuição imunohistoquímica do GH, GHBP e GHR, no desenvolvimento embrionário de germes dentários de ratos. No 17º dia do desenvolvimento, quando os germes dentários estavam em fase de botão, foram encontradas células positivas para a GHBP e GHR. Em adição, células imunorreativas para o GH foram localizadas nos primórdios osteogênicos do futuro osso, subjacente aos germes dentários (Zhang et al., 1997). No estágio de capuz, 18º dia, osteoblastos no novo osso da mandíbula foram intensivamente positivos para o GH, GHBP e GHR. Germes dentários nos 20/21º dias estavam na fase inicial de campânula. Tanto o epitélio dentário interno, o

externo, bem como o tecido mesenquimal entre o epitélio dentário e o osso foram positivos para o GH e para a GHBP. O GH, a GHBP e o GHR foram coincidentes com a diferenciação inicial dos pré-odontoblastos da papila dentária. O folículo dentário (futuro ligamento periodontal) e osteoblastos do osso alveolar foram positivos para as 3 proteínas. Portanto, GH, GHBP e GHR são expressos em células odontogênicas, passando por morfodiferenciação, histodiferenciação e dentinogênese (Zhang et al., 1997).

2.3 Doença periodontal: aspectos microbiológicos e imunológicos

Doença periodontal representa um grupo de doenças bucais crônicas caracterizadas por infecção e inflamação dos tecidos periodontais. Estes tecidos circundam, protegem e suportam os dentes. A colonização de bactérias bucais na superfície do dente leva à formação do biofilme dental, que abriga espécies patogênicas (patógenos periodontais). Estes microorganismos provocam a resposta inflamatória do tecido conjuntivo gengival, caracterizando a gengivite. Nos casos em que o processo inflamatório persiste, pode ocorrer um estado inflamatório crônico não-reversível das estruturas de suporte (Armitage, 1999).

Níveis de espécies subgengivais como *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola* são importantes para o estabelecimento e progressão da destruição periodontal em casos de periodontites crônica e agressiva (Faveri et al., 2009; Teles et al., 2008; Ximénez-Fyvie et al., 2000). A detecção destes microorganismos subgengivais, reconhecidos como patógenos periodontais clássicos, tem sido realizada através da utilização de técnicas moleculares. Estas técnicas moleculares provêem recursos para identificar não somente espécies de microorganismos, mas também comunidades com potencial patogênico importante (Sanz; Winkelhoff, 2011).

A progressão da doença periodontal estabelece condições de destruição das fibras colágenas e sua inserção na superfície radicular, assim como reabsorção do osso alveolar, com consequente perda do dente, se o tratamento periodontal não for

realizado no momento adequado (Offenbacher, 1996).

A composição microbiológica do biofilme subgengival de sítios com doença periodontal foi muito estudada (Haffajee; Socransky, 1994; Zambon, 1996). Ao analisar indivíduos com saúde periodontal e indivíduos com diferentes formas de doença periodontal, foi observado que existe alteração na microbiota subgengival, de acordo com a progressão do estado de saúde periodontal para gengivite e periodontite (Moore; Moore, 1994). Níveis subgengivais de *P.gingivalis*, *T.forsythia* e *T.denticola* estão significativamente mais elevados em indivíduos com periodontite (Haffajee et al., 1998). Espécies bacterianas similares foram encontradas em amostras de biofilme subgengival de pacientes periodontalmente saudáveis e doentes, embora os níveis e proporções difiram consideravelmente, com proporções aumentadas em indivíduos com periodontite em relação a indivíduos periodontalmente saudáveis (Dahlén et al., 1992; Dahlén et al., 1995; Tanner et al., 1996; Ali et al., 1997; Ximénez-Fyvie et al., 2000). Além disso, comparando-se a contagem média de bactérias subgengivais, em sítios com a mesma Profundidade Clínica de Sondagem (PCS), $\leq 3\text{mm}$, em indivíduos com periodontite e indivíduos periodontalmente saudáveis, observa-se que a contagem é significativamente maior no grupo de indivíduos com periodontite. Isto mostra que a PCS não é o único fator determinante para a diferença encontrada na composição da microbiota subgengival entre estes indivíduos (Ximénez-Fyvie et al., 2000). Uma das possibilidades é que essas bactérias nos sítios rasos dos indivíduos com periodontite tenham se originado dos sítios profundos (Riviere et al., 1996).

Embora as doenças periodontais sejam iniciadas por espécies bacterianas agrupadas no biofilme, a intensidade da resposta do hospedeiro às mudanças microbianas é responsável pela destruição periodontal (Page; Kornman, 1997). Existe evidência de que a resposta deficiente do hospedeiro aumenta a destruição periodontal e de que uma resposta exacerbada também agrava a destruição periodontal (Graves, 2008).

A ativação das citocinas inflamatórias, produzidas pelos monócitos, é um mecanismo essencial na resposta de defesa do hospedeiro contra os patógenos. Em caso de resposta exacerbada do hospedeiro, ocorre excessiva produção de citocinas inflamatórias (como a IL-1, $\text{TNF}\alpha$ e IL-6), em resposta aos

microorganismos e antígenos, com consequente destruição das estruturas de suporte (Gemmell et al., 1997).

Quimiocinas fazem parte de uma larga família de citocinas quimiotáticas (mediadores inflamatórios) que estimulam o recrutamento de células inflamatórias. Elas são encontradas no fluido e tecido gengivais e produzidas (em resposta a produtos bacterianos ou moléculas inflamatórias) por células do periodonto, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, osteoclastos, células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e mastócitos (Graves, 2008; Berglundh; Donati, 2005). Elas recrutam as células, como os neutrófilos, para proteger o periodonto contra a invasão bacteriana (Yu et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios (Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)), as Prostaglandinas e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) afetam as atividades dos leucócitos, osteoblastos, osteoclastos e promovem o processo de remodelação tecidual local e sistemicamente (Cazalis et al., 2009; Sorsa et al., 2006; Birkedal-Hansen, 1993). As enzimas colagenolíticas, como as MMPs, são mediadas por uma variedade de citocinas inflamatórias, como as IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (Uitto et al., 2003; Okada; Murakami, 1998). A IL-17, associada com periodontite crônica (Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005), atua estimulando células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas a produzirem outros mediadores como IL-1, IL-6, TNF- α (Beklen et al., 2007), IL-8 e Prostaglandinas (Fossiez et al., 1996).

Mesmo na periodontite crônica, elementos de fase aguda são parte da imunidade inata e mostram a influência da inflamação sistêmica na periodontite, que tem como um dos mediadores inflamatórios a Proteína C-Reativa (CRP), mediador de fase aguda (Ebersole; Cappelli, 1984). A CRP tem sido indicada como um mediador inflamatório comum na periodontite e nas doenças sistêmicas. Estudos têm demonstrado correlação entre periodontite e níveis de CRP no sangue (Buhlin et al., 2003; Noack et al., 2001), saliva e fluido gengival (Pederson et al., 1995; Sanders et al., 2009, Kumari et al., 2014).

Em estudo caso-controle, indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica apresentaram níveis (séricos e no fluido gengival) de CRP mais altos do que no grupo controle (Oztekin et al., 2013). Em mesmo tipo de estudo, indivíduos com

artrite reumatóide apresentaram mesmo índice de placa bacteriana, maior índice gengival, perda óssea mais severa e níveis séricos mais elevados de CRP, em relação aos controles (Rajkarnikar et al., 2013). Pacientes com doença renal crônica apresentaram redução dos níveis séricos de CRP após o tratamento periodontal não-cirúrgico (Yazdi et al., 2013), da mesma forma que ocorreu em pacientes com hipertensão refratária (Vidal et al., 2013). Também foi encontrada associação da periodontite crônica com Diabetes Mellitus (DM) tipo 2. Neste caso, indivíduos com DM e periodontite crônica apresentaram níveis de CRP (séricos e no fluido gengival) aumentados quando comparados com indivíduos com periodontite crônica somente e com indivíduos saudáveis (Kalra et al., 2013).

2.4 Fluido gengival como ferramenta auxiliar de diagnóstico periodontal

O fluido gengival (FG) emerge entre a superfície dentária e a camada externa do epitélio juncional. Em saúde, representa um fluido intersticial que aparece no sulco como resultado de um gradiente osmótico e é considerado um transudato. Com o acúmulo de placa ocorre uma resposta inflamatória no tecido gengival, resultando em um aumento de permeabilidade nos capilares e uma elevação do fluxo do FG. Neste estágio, o FG torna-se um verdadeiro exsudato, com uma concentração de proteínas similar à do soro (Griffiths, 2003).

Em pacientes com periodontite, o FG contém células inflamatórias, proteínas séricas, bactérias, enzimas, anticorpos, complemento e mediadores inflamatórios (Cimasoni, 1983; Armitage, 1996). A taxa do fluxo do FG aumenta em sítios com perda clínica de inserção quando comparados a sítios saudáveis (Oliver et al., 1969; Goodson, 2003). A coleta do FG é relativamente não-invasiva, tornando-se uma ferramenta convencional para avaliar marcadores de inflamação periodontal. A magnitude da inflamação pode ser determinada através da mensuração de citocinas inflamatórias e imunoregulatórias no FG. Sítios com inflamação gengival apresentam elevados níveis de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , que têm papel importante na patogênese da Periodontite (Genco, 1992).

2.5 Níveis séricos de biomarcadores inflamatórios como ferramenta auxiliar de diagnóstico periodontal

A avaliação dos níveis séricos de citocinas pro e anti-inflamatórias, além de ser importante por ajudar a estudar o papel delas na resposta do hospedeiro, é fundamental para a determinar o estado inflamatório sistêmico de pacientes com periodontite. Pacientes com periodontite apresentam níveis (sistêmicos e no fluido gengival) de CRP mais elevados do que pacientes com Gengivite e pacientes saudáveis (Kumari et al., 2014). Em estudo caso-controle realizado com mulheres grávidas, com e sem Diabetes Mellitus, observou-se que, no grupo de gestantes diabéticas, a periodontite era mais prevalente e severa e os níveis séricos de CRP mais altos (Chokwiriyaichit et al., 2013). Após o tratamento periodontal não-cirúrgico, pacientes com doença coronariana estável apresentaram redução dos níveis sistêmicos de IL-6, TNF- α e CRP, em comparação aos controles, que apresentavam a mesma condição coronariana e que só receberam orientação de higiene bucal (Zhou et al., 2013).

2.6 Associação da DGH com a resposta imunológica

Evidência científica considerável tem sido acumulada, ao longo das últimas duas décadas, a cerca das interações fisiológicas importantes entre os sistemas imune e endócrino (Kelley et al., 2007). Reguladores imunológicos não exercem função isoladamente, uma vez que interações fisiológicas complexas são essenciais para uma homeostasia imunológica. A forma mais conhecida de transmissão de informações do sistema imune para o neuroendócrino é humoral, através de citocinas. Reciprocamente, do sistema nervoso para o imune, a transmissão ocorre por meio do sistema nervoso autônomo. A comunicação é possível, já que os dois sistemas possuem mecanismos bioquímicos comuns, envolvendo ligantes e receptores, incluindo neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, hormônios neuroendócrinos e citocinas (Mukherjee et al., 2010).

Células do sistema imune secretam e/ou têm receptores para muitos hormônios (Rappaport et al., 1995). Em particular, GH e IGF-I têm participação importante no sistema imune, afetando tanto a mediação de célula, quanto a resposta humoral (Clark, 1997). Dados experimentais mostram que o GH estimula a proliferação dos linfócitos, especialmente dos linfócitos-B, possivelmente via IGF-I, além de atuar na síntese de imunoglobulinas (Geffner et al., 1990; Bozzola et al., 1988; Yoshida et al., 1992; Kimata; Yoshida, 1994). Receptores das citocinas são expressos no sistema neuroendócrino (Benvenist, 1998). Citocinas produzidas por células do sistema imune podem, especificamente, influenciar a secreção pituitária do GH (Arzt et al., 1999).

Aumento dos níveis de IL-6 foi observado em indivíduos com GHD, independentemente de fatores como o índice de massa corpórea e obesidade. O tratamento com reposição do GH reduziu efetivamente a produção de IL-6 pelos monócitos (Serri et al., 1999). Aumento nos níveis de TNF- α foi observado em crianças com GHD, em comparação com os controles. O tratamento com GH também reduziu significativamente os níveis desta citocina (Andiram; Yordam, 2007).

A administração do GH aumenta a concentração de hemoglobina em pacientes com GHD e aumenta a função das células mielóides e dos neutrófilos (Rapaport et al., 1995). Em adição, alguns autores mostram que GHD reduz a atividade de células “natural killer”, a síntese de anticorpos e predispõe a defeito na imunidade celular (Kiess et al., 1986; Edwards et al., 1991), sendo ainda necessária uma integridade funcional do eixo GH para que haja a manutenção da função tímica normal, em humanos adultos (Morrhaye et al., 2009).

2.7 IGHD X Imunologia

Estudo sobre longevidade nos indivíduos com IGHD de Itabaianinha constatou uma alta frequência de mortes em mulheres com IGHD e com idades entre 4-20 anos. A partir de 20 anos, nenhuma diferença na duração de vida entre

indivíduos com IGHD, seus irmãos e a população geral foi encontrada, sugerindo que a IGHD não é um fator de risco para mortalidade cardiovascular na meia-idade ou idade avançada. No entanto, as mortes precoces ocorreram por doença infecciosa e desidratação, devido a doenças diarréicas, levando à possibilidade de associação dessas mortes a causas imunológicas (Aguiar-Oliveira et al., 2010). Um outro fator importante é que o volume do baço, corrigido pela área da superfície corporal, é reduzido nestes indivíduos (Oliveira et al., 2008). Como o baço é um órgão importante no sistema imune, atuando na defesa contra as infecções agudas (Lynch; Kapila, 1996), é importante investigar se o aumento na mortalidade destes pacientes com idades abaixo de 20 anos se deve a uma deficiência imunológica associada à severa IGHD.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos locais e sistêmicos da IGHD na resposta imune, bem como comparar os níveis dos patógenos periodontais, nos indivíduos com IGHD e controles, correlacionando-os com a PCS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População e desenho do estudo

Os sujeitos com IGHD da população do estudo foram identificados em uma larga família com a deficiência. Ela compreende aproximadamente 105 indivíduos (ao longo de 7 gerações, em uma população total de 32.000, correspondendo a uma prevalência de 1 caso de nanismo para cada 304 habitantes), com idades entre 5 e 84 anos (Salvatori et al., 1999). Esta coorte única (a maior coorte de indivíduos com a IGHD descrita até o momento) reside no município de Itabaianinha, que está localizado no nordeste do Brasil, no estado brasileiro de Sergipe. Artesanato, agricultura e pequenos negócios são as suas principais atividades. A propagação da mutação nesta área é facilitada pela limitada mobilidade dos indivíduos (limitado deslocamento geográfico) da mesma e pela alta prevalência de casamentos consanguíneos (21,7% de 322 uniões examinadas) (Salvatori et al., 1999).

Figura 4.1 – Localização geográfica do município de Itabaianinha em relação ao estado brasileiro Sergipe, bem como à sua capital Aracaju

Figura 4.2 - Imagem representativa do município Itabaianinha

Dos 105 indivíduos descritos em 1999 (Salvatori et al., 1999), 75 foram identificados recentemente, já que o nanismo é relatado há 200 anos e os dados de alguns indivíduos que faleceram no passado remoto não puderam ser recuperados. Destes, 53 estavam vivos e 22 mortos (Aguiar-Oliveira et al., 2010). Alguns indivíduos não foram incluídos no estudo clínico periodontal inicial devido à mudança de endereço e por não disporem de telefone ($n=4$). Os critérios de exclusão foram: idade menor que 18 ($n=4$), edentulismo ($n=5$), tratamento periodontal ($n=0$) ou terapia de reposição do GH ($n=8$) previamente à realização do estudo. Portanto, dos 49 indivíduos com IGHD contatados, a amostra final elegível do estudo ficou composta por 32 indivíduos com IGHD e 32 sem IGHD pareados por idade, gênero, condição sócio-econômica, hábito de fumo e diabetes (Britto et al., 2011) (ANEXO A). Estes indivíduos foram procurados durante o presente estudo. No entanto, 1 havia falecido, 5 não quiseram participar, 5 estavam com problemas de saúde e 2 perderam todos os dentes. Portanto, a nossa amostra ficou composta por 19 indivíduos com IGHD e 19 indivíduos no grupo controle.

Figura 4.3 – Fluxograma representativo da obtenção dos indivíduos do grupo com IGHD

Figura 4.4 – Associação dos Anões, local onde foram realizadas as coletas de dados

4.2 Considerações Éticas

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (Nº CAAE 0073.0.107.107-08) (ANEXO B) e, em seguida, ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Nº CAAE 26175513.2.0000.0075) (ANEXO C). Todos os indivíduos que participaram do estudo foram informados sobre a sua natureza e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO D), que foi lido a todos os indivíduos elegíveis. A todos os indivíduos que aceitaram a participação no estudo, foi solicitada a assinatura do mesmo após o completo entendimento do seu conteúdo. Aos que não assinavam, a aceitação foi comprovada pela impressão digital. Como o estudo contou com a presença de um consultório odontológico portátil¹, tratamentos urgentes foram realizados, de acordo com as necessidades individuais, bem como orientação de higiene bucal. O tratamento periodontal, que está sendo conduzido, bem como a prevenção da progressão da doença, podem ser realizados da forma mais eficiente. Além disso, este estudo traz um benefício para a população como um todo, já que existem muitos indivíduos com deficiência do hormônio do crescimento em níveis intermediários.

4.3 Dados demográficos, antropométricos e glicêmicos

Foram utilizados os questionários (ANEXO E) que haviam sido aplicados no estudo inicial (Britto et al., 2011) e adicionados dados que foram modificados durante este intervalo de tempo. O diagnóstico de diabetes mellitus foi realizado mais uma vez nesta nova etapa do estudo, em todos os indivíduos, através da determinação da glicemia capilar plasmática (GCP) casual, em mg/dL, utilizando o dispositivo Accu-Check (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

¹ Consuldent, Brasil

² Mirror #5, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

Tabela 4.1 – Valores de glicose plasmática (mg/dL) para diagnóstico de Diabetes Mellitus e seus estágios pré-clínicos

Categorias	Jejum ¹	2h após 75g de glicose	Casual ²
Glicemia de jejum alterada	>100 e < 126	< 140 (se realizada)	
Tolerância à glicose diminuída	< 126	≥ 140 e < 200	
Diabetes Mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos) ³

¹ O jejum é definido como a falta de ingestão calórica de, no mínimo, 8 horas.

² Glicemia plasmática casual é definida como aquela realizada a qualquer hora do dia, sem observar o intervalo da última refeição.

³ Os sintomas clássicos do Diabetes Mellitus incluem poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso.

Nota: O diagnóstico do Diabetes Mellitus deve, sempre que possível, ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de Diabetes Mellitus.

4.4 Dados Clínicos

Os exames clínicos foram realizados por um único examinador treinado e calibrado (IA). Foram realizados em consultório odontológico portátil, que foi instalado na associação dos anões, no município de Itabaianinha. Os indivíduos que não puderem comparecer ao local foram atendidos em sua própria residência. Nestes casos, o consultório odontológico portátil foi deslocado até a mesma, com o auxílio do micro-ônibus cedido pela Universidade Federal de Sergipe. Os exames foram realizados em diferentes horários do dia, da noite e da semana, com a finalidade de aumentar a aderência ao estudo. Para evitar cansaço excessivo do examinador, levando em consideração a variação na acuidade visual e no senso tátil

(World Health Organization, 1997), foram realizados, no máximo, 10 exames clínicos por dia.

Figura 4.5 - Consultório Odontológico Portátil instalado na Associação dos Anões, para que os dados clínicos fossem coletados

Utilizando um espelho clínico plano² e uma sonda periodontal milimetrada manual³, posicionada paralelamente ao longo eixo de cada dente, os sulcos/bolsas foram examinados em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual/palatina, lingual/palatina e disto-lingual/palatina) em todos os dentes permanentes, com exceção dos terceiros molares e dentes em processo de erupção. Quantidades excessivas de cálculo que dificultaram um correto registro dos parâmetros pela sonda foram removidas previamente com o auxílio de curetas⁴. Os parâmetros clínicos registrados foram (ANEXO F):

1. Profundidade Clínica de Sondagem (PCS): distância (mm) compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal.
2. Sangramento à Sondagem: Positivo caso o sangramento tenha ocorrido dentro de 15 segundos após a medição da PCS.

² Mirror #5, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

³ PCPUNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

⁴ Gracey curettes 5/6, 11/12, 13/14 Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

3. Distância da junção esmalte-cimento à margem gengival (JEC-MG): distância (mm) que vai da linha esmalte-cimento (LEC) à margem gengival. Se a LEC estiver localizada apicalmente à margem gengival, o parâmetro recebeu um valor negativo.

4. Nível Clínico de Inserção (NCI): é o valor correspondente à soma⁵ dos valores de PCS e JEC-MG.

Dois sítios por dente (vestibular e lingual/palatina) foram avaliados para as seguintes variáveis:

5. Índice de placa visível (Ainamo; Bay, 1975): foram considerados dentes com placa aqueles que apresentassem, no mínimo, 1 sítio (vestibular ou lingual/palatina) com placa visível a olho nu. Sítios com ou sem placa visível foram classificados como 1 ou 0, respectivamente.

6. Ausência/Presença de cálculo supra-gengival: cálculo supra-gengival foi definido como depósitos calcificados localizados em uma coroa exposta e/ou superfícies radiculares que se estendessem em até 1mm abaixo da margem gengival livre (Susin, 2004).

Avaliação da reprodutibilidade das variáveis

O único examinador foi calibrado por um examinador com experiência em pesquisa de campo (PC) para realizar o exame clínico (15 dias antes e 4 meses após o início do estudo), sob as mesmas condições em que realizou a mensuração dos parâmetros clínicos. A concordância intra-examinador para PCS e PCI foi avaliada por exames duplicados em quadrantes contra-laterais de todos os dentes em, aproximadamente, 10% do valor total da amostra (4 indivíduos). O exame foi

⁵ NCI=PCS + (JEC-MG)

repetido 7 dias após o primeiro exame (Beck; Løe, 1993). O coeficiente de correlação intra-classes (CCI) (Shrout; Fleiss, 1979) para PCS e NCI foi calculado a nível de sítio. Valor Kappa 0,92.

4.5 Coleta do fluido gengival

O fluido gengival foi coletado, pelo único examinador (IA), 1 semana após o exame clínico, para que este não alterasse a sua composição. Após a remoção do biofilme supragengival, delicadamente, com bolinhas de algodão, os sítios foram isolados e cuidadosamente secos com seringa de ar, para evitar sua possível contaminação com saliva. As amostras foram randomizadas em diferentes quadrantes e obtidas em 4 sítios não adjacentes para cada indivíduo, sendo 2 sítios com PCS < 3mm e 2 sítios com PCS $\geq$ 7mm (ou o pior parâmetro registrado na boca). Em cada indivíduo do grupo controle, as amostras foram coletadas com os mesmos critérios clínicos (mesmas PCS). O fluido foi coletado através da inserção de tiras de papel padronizadas (*periopaper*; Oraflow, Plainview, NY, USA) dentro do sulco/bolsa periodontal e removidas após 30 segundos. As tiras visualmente contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras foram armazenadas no freezer a -80°C (Indrel, Paraná), em Itabaianinha. A seguir, foram transportadas para São Paulo (FOUSP) na caixa isotérmica para transporte de amostras, para que fossem feitos o processamento e a análise das amostras.

4.6 Coleta do biofilme subgengival

Os mesmos sítios selecionados para coleta do fluido gengival foram utilizados, pelo único examinador (IA), para a coleta microbiológica. O biofilme supragengival foi removido e foram realizadas as coletas das amostras de biofilme subgengival com curetas Gracey do tipo mini-five (Hu-friedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. Para cada amostra foi utilizada uma ponta estéril da cureta. A seguir, as amostras foram depositadas em tubos de

polipropileno de 1,5 ml (tubo I) contendo 200µl de solução TE (10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) e armazenadas no freezer a -80°C (Indrel, Paraná), em Itabaianinha. A seguir, foram transportadas para São Paulo (FOUSP), na caixa isotérmica para transporte de amostras, para que fosse feita a extração do DNA e todo o processamento e análise das amostras.

4.7 Coleta sanguínea

O sangue foi coletado no Posto de Coleta de Maria (posto de coleta onde todos os indivíduos de Itabaianinha realizam coletas de sangue quando necessitam realizar exames de rotina). A coleta sempre é realizada por uma única enfermeira. Após o exame clínico e coletas periodontais, os indivíduos foram levados até o posto de coleta com o auxílio do micro-ônibus concedido pela Universidade Federal de Sergipe. As amostras de sangue foram coletadas da mesma forma que seriam coletadas para exames de rotina. Soro e plasma foram obtidos pela centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e armazenados a -80°C.

4.8 Análise microbiológica

A extração do DNA das amostras do biofilme subgengival dos pacientes foi realizada com a utilização kit Qiaamp DNA Mini kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As amostras contendo DNA foram quantificadas no espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific) e depois armazenadas a -20°C, até o processamento.

Foram analisados os níveis dos patógenos periodontais *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A.actinomycetemcomitans* e *T. denticola*.

A análise quantitativa para Aa, Pg, Tf e Td foi feita por meio da técnica da qPCR em tempo real, utilizando termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Life Technologies Co, NY, USA), e os produtos foram detectados por fluorescência, usando o Power Sybr Green® (Life Technologies Co., NY, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a reação foram utilizados 10µl de Power Sybr Green®, 2,0 µl do DNA molde, 0,5 µl de cada iniciador (primers forward e reverse específicos) e água milliQ estéril, em volume total de 20µl. Para a curva padrão, foram realizadas reações contendo como DNA molde 10 a 10⁷ cópias do gene analisado, de cada uma das espécies avaliadas (*16S rRNA*), utilizando-se plasmídeos pTOPO, em que foram clonados os genes *16SrRNA* dos diferentes organismos.

Como controle negativo, foi adicionada água milliQ estéril, ao invés de DNA molde. As reações para 16S rRNA foram padronizadas em ciclos específicos, para cada bactéria. Os ciclos de amplificação foram: 95°C/15'', 65°C/1', 81°C/10'', 40 ciclos para Aa; 95°C/15'', 60°C/1', 81°C/10'', 40 ciclos para Pg; 95°C/15'', 60°C/1', 74°C/10'', 40 ciclos para Tf, 95°C/15'', 60°C/1', 83,7°C/10'', 40 ciclos para Td. A fluorescência foi detectada após cada ciclo e representada em um gráfico, utilizando o software StepOnePlus Real-Time PCR System™ (Applied Biosystems®, Life Technologies Co, NY, USA). As diluições da curva padrão, assim como todas as amostras, foram analisadas em triplicata. Os níveis de bactérias foram expressos em números de cópias do gene 16S rRNA.

Para *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola* utilizou-se uma curva padrão, com a diluição dos plasmídeos variando de 10⁷ a 10 cópias do gene analisado. Para *P. gingivalis* e *T. forsythia*, a curva foi de 10⁷ a 10² cópias do gene analisado.

4.9 Análise do fluido gengival e do soro

Para cada *periopaper* foram adicionados 250 µL de solução salina tampão fosfato (PBS). Em seguida, foi feito o vórtex por 3 vezes consecutivas, durante 30s cada. Os *periopapers* foram removidos e as amostras centrifugadas a 10000g por 10

minutos. O sobrenadante foi removido e as amostras congeladas a -80°C .

Para o soro coletado, previamente à análise pelo Luminex, as amostras foram pipetadas para o volume de 100uL para cada microtubo (já que as amostras haviam sido armazenadas em volume superior ao necessário para a análise).

O painel utilizado foi o Bio-plex Pro Assays (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Foram analisadas as citocinas: IL-1a, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , CRP, Leptina, Adiponectina, MMP-8, MMP-9). O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante. O filtro da placa multiwell 96 foi molhado com Tampão de ensaio (Bio-Rad). Após retirada do tampão, foram adicionadas as esferas conjugadas com anticorpos anti-citocinas (Bio-Rad), seguidas de duas lavagens com tampão de lavagem. Em seguida, 100 μL da solução do fluido gengival/soro dos indivíduos, curva padrão e branco foram adicionados. A placa foi incubada por uma noite, a 4°C , sob agitação. Em seguida, foi novamente lavada com o tampão de lavagem e adicionado, a cada poço, o anticorpo de detecção biotinilado (Bio-Rad). Formou-se um “sanduíche” de anticorpos, que foi incubado por 1h. Após esse período, novas lavagens com o tampão de lavagem foram realizadas e adicionada Streptavidin conjugada com PE (Bio-Rad), que se ligou ao anticorpo biotinilado, por 10 minutos. Novas lavagens foram realizadas com o Tampão de lavagem e o “sanduíche” de anticorpos ressuspendido com Tampão de ensaio (Bio-Rad). As placas foram analisadas no Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex (Bio Rad, Hercules, CA) através do Software Bio-Plex Manager, versão 6.0 (Bio Rad, Hercules, CA). Os parâmetros para a corrida do kit para citocinas humanas foram ajustadas para baixo fotomultiplicador durante a calibração, 50 esferas por região e 100 μl de volume da amostra.

4.10 Dosagem de proteínas do fluido gengival

A dosagem de proteínas foi feita por método colorimétrico, utilizando-se o kit *BCA protein assay* (Thermo Scientific, USA). A curva padrão foi feita com concentrações entre 2 e 0,125 mg/ml de Albumina Bovina Sérica (BSA), e as amostras foram diluídas 1:10. Para preparar a placa, pipetou-se 10 µl de cada ponto da curva padrão e das amostras, em duplicata. Foram adicionados 200 µl do reagente BCA, em cada poço, e incubados por 40 minutos, a 37°C. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (uQuant, Biotek, USA), no comprimento de onda de 570 nm, e o cálculo das concentrações foi feito por regressão linear, utilizando-se o software KC4 (Biotek, USA). A curva padrão, relação gráfica entre os valores de absorbância e concentração, foi considerada adequada quando o valor do coeficiente de correlação (r) estava entre 0,995 e 1. Os resultados foram expressos em mg/ml.

4.11 Análise Estatística

Os dados clínicos foram obtidos a partir de 6 sítios por dente para PCS, Ret/hiperplasia (JEC-MG), NCI e SS. Os parâmetros clínicos médios foram determinados pela média de todos os sítios, de todos os dentes, em cada indivíduo e, depois, comparados entre os indivíduos de cada grupo clínico separadamente.

Os parâmetros clínicos médios para cada categoria de sítio foram calculados pela média dos valores dos sítios coletados de cada indivíduo e, depois, comparados entre indivíduos em cada categoria de sítio, para cada grupo clínico, separadamente.

Os níveis de cada mediador inflamatório foram medidos em amostras coletadas em cada categoria de sítio, a partir de cada indivíduo. O nível médio de cada biomarcador no FG foi calculado pela média entre os indivíduos, em cada categoria de sítio, em cada grupo clínico, separadamente.

Os dados microbiológicos disponíveis foram expressos pelas contagens de cada uma das 4 espécies testadas, para 4 amostras de biofilme subgengival, por indivíduo (2 amostras de sítios rasos e 2 amostras de sítios profundos) . Os dados de cada espécie foram expressos em contagens x 10^5 em cada sítio. Os dados microbiológicos foram analisados como uma média, dentro de cada indivíduo e para cada categoria de sítio e, depois, esta média comparada entre os indivíduos, em cada categoria de sítio, em cada grupo clínico, separadamente.

Inicialmente foi verificado se havia adesão à curva normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene. Quando estes quesitos foram preenchidos, o teste *t de student* foi utilizado para comparar as médias das variáveis contínuas. No caso de não-homogeneidade de variâncias, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. O teste de qui-quadrado foi utilizado para verificar se havia associação entre as variáveis qualitativas. Para verificar se havia correlação entre variáveis contínuas, foi usado o coeficiente de correlação de Pearson.

Um diferença foi considerada estatisticamente significativa se o valor de *p* fosse menor do que o nível de significância deste estudo, considerado 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa SPSS para Windows, versão 11.0.

5 RESULTADOS

Características dos indivíduos

A Tabela 5.1 descreve as características biológicas, comportamentais e clínicas periodontais dos IGHD e controles. Por definição, idade, gênero, tabagismo e diabetes não apresentaram diferença entre os grupos ($p=0,99$ para idade e $p=1,00$ para gênero, tabagismo e diabetes).

Características clínicas

Considerando os parâmetros clínicos avaliados na boca toda, os indivíduos com IGHD apresentaram maior média de PCS ($p=0,03$), estatisticamente significativa, do que os controles. Média de Retração/hiperplasia gengival e média de NCI não apresentaram diferença estatística entre os grupos ($p=0,30$ e $0,07$, respectivamente). Como esperado, nos sítios de coleta rasos e profundos, as médias de PCS foram semelhantes para os grupos. Considerando as médias de Retração/hiperplasia e NCI nos sítios de coleta rasos e profundos, a única variável que apresentou diferença, estatisticamente significativa, entre os dois grupos foi a média de NCI no sítio de coleta profundo.

Indivíduos com IGHD apresentaram quantidade semelhante de biofilme ($p = 0,3$), menos cálculo supragengival ($p = 0,02$), e mais sangramento à sondagem ($p = 0,02$), em comparação aos indivíduos do grupo controle. Em relação ao diagnóstico de periodontite crônica, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,65$), quanto à severidade e extensão (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Características biológicas, comportamentais e clínicas periodontais, dos indivíduos com IGHD e dos controles

Variável		IGHD (n = 19)	Controles (n = 19)
Idade (anos)	20-29	2	2
	30-39	7	6
	40-49	2	3
	50-59	5	5
	60+	3	3
Gênero, Masculino		10	10
Fumantes ou ex-fumantes		6	6
<i>Diabetes mellitus</i>		1	1
Média PCS (mm)		3,28*±0,53	2,98±0,25
Média Ret/hiperplasia (mm)		0,43±0,60	0,22±0,62
Média NCI (mm)		2,69±0,97	2,17±0,67
Média PCS sítio coleta raso (mm)		1,20±0,53	1,09±0,53
Média PCS sítio coleta profundo (mm)		5,13±1,03	4,9±0,79
Média NCI sítio coleta raso (mm)		2,21±1,07	2,02±1,23
Média NCI sítio coleta profundo (mm)		6,07*±2,05	4,9±1,10
Média Ret sítio coleta raso (mm)		0,079±1,00	0,079±1,13
Média Ret sítio coleta profundo (mm)		0,89±1,49	0,44±1,73
Sangramento à Sondagem % sítios	≤ 15%	31,6	63,1
	> 15%	68,4*	36,9
Biofilme visível % sítios	< 50%	42,1	52,6
	≥ 50%	57,9	47,4
Cálculo supragengival % sítios	≤ 15%	65,3	34,4
	> 15%	34,7	65,6*
Periodontite crônica moderada localizada (n) (diagnóstico)		15	17

* Diferença estatística a nível de 5%

Achados microbiológicos e imunológicos

Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, nos níveis dos patógenos periodontais avaliados, *T. forsythia* (*T.f*), *T. denticola* (*T.d*) e *P. gingivalis* (*P.g*) e *A.actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Tabela 5.2). Ao analisar as citocinas do fluido gengival, os indivíduos com IGHD apresentaram mais MMP-8 e mais CRP (estatisticamente significantes), do que os controles, nas amostras coletadas de sítios profundos (Tabela 5.3). No soro, os indivíduos com IGHD apresentaram mais IL-17 do que os controles (estatisticamente significativa). Em relação às outras citocinas avaliadas, não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 5.4).

Tabela 5.2 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis dos patógenos periodontais (número de cópias, com transformação logarítmica), entre os indivíduos com IGHD e os controles

Variável	IGHD (n = 19)	Controles (n = 19)	<i>p</i>
<i>T.f</i> raso	3,06±1,40	3,53±1,06	0,25
<i>T.f</i> prof	4,85±1,56	4,63±1,25	0,63
<i>T.d</i> raso	2,68±1,31	2,51±1,15	0,69
<i>T.d</i> prof	4,39±1,35	3,97±1,52	0,38
<i>P.g</i> raso	0,53±1,57	1,00±1,08	0,29
<i>P.g</i> prof	1,62±2,12	1,63±1,65	0,44
<i>A.a</i> raso	4,54±0,92	4,53±1,12	0,97
<i>A.a</i> prof	5,01±1,34	4,69±0,99	0,41

Tabela 5.3 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas no fluido gengival (PG/ML), dos indivíduos com IGHD e dos controles

Variável	IGHD (n = 19)	Controles (n = 19)	<i>p</i>
TNF- α raso	3,62 $\pm$ 2,27	3,68 $\pm$ 1,85	0,93
TNF- α prof	9,97 $\pm$ 9,16	5,62 $\pm$ 4,90	0,07
MMP-9 raso	53469 $\pm$ 31391	59996 $\pm$ 38446	0,57
MMP-9 prof	473084 $\pm$ 611486	255837 $\pm$ 197265	0,14
MMP-8 raso	11530 $\pm$ 10221	12541 $\pm$ 13952	0,8
MMP-8 prof	241003 $\pm$ 265718	90767 $\pm$ 93808	0,02*
IL-6 raso	1,23 $\pm$ 0,86	1,09 $\pm$ 1,01	0,65
IL-6 prof	33,92 $\pm$ 39,37	20,55 $\pm$ 18,80	0,19
IL-8 raso	125,33 $\pm$ 94,17	133,56 $\pm$ 120,98	0,81
IL-8 prof	1483,95 $\pm$ 1997,0	621,19 $\pm$ 724,92	0,06
IL-1a raso	527,80 $\pm$ 558,98	539,03 $\pm$ 417,97	0,94
IL-1a prof	7056,84 $\pm$ 6734,15	4390,92 $\pm$ 3114,17	0,54
CRP raso	580,64 $\pm$ 753,47	386,05 $\pm$ 705,38	0,41
CRP prof	3862,29 $\pm$ 6135,54	784,47 $\pm$ 909,09	0,00*

* Diferença estatística a nível de 5%

Tabela 5.4 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas no soro (PG/ML), dos indivíduos com IGHD e dos controles

Variável	IGHD (n = 19)	Controles (n = 19)	p
TNF- α	4,87 $\pm$ 4,31	3,87 $\pm$ 1,52	0,34
MMP-9	13720 $\pm$ 10620	11721 $\pm$ 11220	0,57
MMP-8	9554 $\pm$ 8969	8503 $\pm$ 10669	0,74
IL-17	6,26 $\pm$ 2,25	4,10 $\pm$ 3,15	0,02*
IL-6	7,25 $\pm$ 4,98	14,36 $\pm$ 40,33	0,45
IL-8	6,02 $\pm$ 4,03	6,24 $\pm$ 2,65	0,84
IL-1a	7,45 $\pm$ 5,44	8,43 $\pm$ 5,90	0,59
CRP	27049 $\pm$ 17276	34082 $\pm$ 20923	0,26

* Diferença estatística a nível de 5%

Avaliando o grupo com IGHD, o fluido gengival coletado em sítios profundos mostrou níveis significativamente mais elevados das citocinas: TNF- α , MMP-9, MMP-8, IL-6, IL-8, IL-1a, CRP, em relação aos sítios rasos. Comparando os níveis de bactérias, os valores encontrados foram significativamente mais altos para *T.f*, *T.d* e *P.g* (Tabela 5.5). No grupo controle, o fluido gengival coletado em sítios profundos mostrou níveis significativamente mais elevados das citocinas: MMP-9, MMP-8, IL-6, IL-8, IL-1a, em relação aos sítios rasos. Comparando os níveis de bactérias, os valores encontrados foram significativamente mais altos para *T.f* e *T. d* (Tabela 5.6).

Tabela 5.5 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas (PG/ML) e dos patógenos periodontais (número de cópias), nos sítios rasos e profundos dos indivíduos com IGHD

Variável	Sítio Raso (n = 19)	Sítio Profundo (n = 19)	p
TNF- α fluido	3,62 $\pm$ 2,27	9,97 $\pm$ 9,16	0,00*
MMP-9 fluido	53469 $\pm$ 31391	473084 $\pm$ 611486	0,00*
MMP-8 fluido	11530 $\pm$ 10221	241003 $\pm$ 265718	0,00*
IL-6 fluido	1,23 $\pm$ 0,86	33,92 $\pm$ 39,37	0,00*
IL-8 fluido	125,33 $\pm$ 94,17	1483 $\pm$ 1997	0,00*
IL-1a fluido	527,80 $\pm$ 558,98	7056 $\pm$ 6784	0,00*
CRP fluido	580,64 $\pm$ 753,47	3862,29 $\pm$ 6135,54	0,02*
<i>T.f</i>	3,06 $\pm$ 1,40	4,85 $\pm$ 1,56	0,00*
<i>T.d</i>	2,77 $\pm$ 1,28	4,56 $\pm$ 1,16	0,00*
<i>P.g</i>	0,53 $\pm$ 1,57	1,62 $\pm$ 2,12	0,01*
<i>A.a</i>	4,53 $\pm$ 0,95	5,01 $\pm$ 1,34	0,16

* Diferença estatística a nível de 5%

Tabela 5.6 - Média, desvio padrão e comparação dos níveis das citocinas (PG/ML) e dos patógenos periodontais (número de cópias), nos sítios rasos e profundos dos indivíduos do grupo controle

Variável	Sítio Raso (n = 19)	Sítio Profundo (n = 19)	p
TNF- α fluido	3,68 $\pm$ 1,85	5,62 $\pm$ 4,90	0,11
MMP-9 fluido	59996 $\pm$ 38446	255837 $\pm$ 197265	0,00*
MMP-8 fluido	12541 $\pm$ 13952	90767 $\pm$ 93808	0,00*
IL-6 fluido	1,09 $\pm$ 1,01	20,55 $\pm$ 18,80	0,00*
IL-8 fluido	133,56 $\pm$ 120,98	621,19 $\pm$ 724,92	0,01*
IL-1a fluido	539,03 $\pm$ 417,97	4390,92 $\pm$ 3114,17	0,00*
CRP fluido	386,05 $\pm$ 705,38	784,47 $\pm$ 909,09	0,06
<i>T.f</i>	3,53 $\pm$ 1,06	4,63 $\pm$ 1,25	0,00*
<i>T.d</i>	2,51 $\pm$ 1,15	4,17 $\pm$ 1,48	0,00*
<i>P.g</i>	0,98 $\pm$ 1,11	1,63 $\pm$ 1,65	0,07
<i>A.a</i>	4,53 $\pm$ 1,12	4,53 $\pm$ 0,73	0,99

* Diferença estatística a nível de 5%

No grupo dos indivíduos com IGHD, foi observada associação forte entre PCS dos sítios de coleta e níveis, no fluido gengival, de MMP-8 ($r=0,48$), IL-1a ($r=0,55$), *T.f* ($r=0,55$) e *T.d* ($r=0,52$). Nestes mesmos indivíduos, associação moderada foi encontrada para PCS dos sítios de coleta e níveis, no fluido gengival, de IL-6 ($r=0,39$), IL-8 ($r=0,39$) e TNF- α ($r=0,33$) (Tabela 5.7). No grupo controle, associação forte foi observada entre PCS dos sítios de coleta e níveis, no fluido gengival, de MMP-9 ($r=0,59$), MMP-8 ($r=0,47$), IL-6 ($r=0,56$), IL-8 ($r=0,44$), IL-1a ($r=0,61$), *T.f* ($r=0,44$) e *T.d* ($r=0,47$).

Tabela 5.7 - Correlação da PCS, do sítio de coleta, com as citocinas do fluido (PG/ML) e com os patógenos periodontais (número de cópias), nos indivíduos com IGHD

Variável	r	p
TNF- α fluido	0,33	0,04*
MMP-9 fluido	0,31	0,05
MMP-8 fluido	0,48	0,00*
IL-6 fluido	0,39	0,01*
IL-8 fluido	0,39	0,01*
IL-1a fluido	0,55	0,00*
CRP fluido	0,22	0,17
<i>T.f</i>	0,55	0,00*
<i>T.d</i>	0,52	0,00*
<i>P.g</i>	0,18	0,28
<i>A.a</i>	0,14	0,38

* Diferença estatística a nível de 5%

Tabela 5.8 - Correlação da PCS, do sítio de coleta, com as citocinas do fluido (PG/ML) e com os patógenos periodontais (número de cópias), nos indivíduos do grupo controle

Variável	r	p
TNF- α fluido	0,21	0,19
MMP-9 fluido	0,59	0,00*
MMP-8 fluido	0,47	0,00*
IL-6 fluido	0,56	0,00*
IL-8 fluido	0,44	0,00*
IL-1a fluido	0,61	0,00*
CRP fluido	0,21	0,18
<i>T.f</i>	0,44	0,00*
<i>T.d</i>	0,47	0,00*
<i>P.g</i>	0,20	0,21
<i>A.a</i>	0,03	0,82

* Diferença estatística a nível de 5%

6 DISCUSSÃO

Não encontramos, na literatura, estudos que tivessem avaliado o efeito da Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento sobre os parâmetros microbiológicos e imunológicos da doença periodontal. Este, possivelmente, foi o primeiro estudo que avaliou estes parâmetros, em indivíduos com IGHD congênita e não tratada.

Neste estudo, que considerou os parâmetros clínicos da boca toda, os indivíduos com IGHD apresentaram maior média de PCS (estatisticamente significativa) do que os controles. Este achado confirma os dados já obtidos no estudo anterior, no qual os indivíduos com IGHD apresentaram maior prevalência ($p < 0,01$), de PCS e NCI $\geq 5\text{mm}$ e $\geq 7\text{mm}$, e extensão, de PCS $\geq 5\text{mm}$ e de NCI $\geq 5\text{mm}$ e $\geq 7\text{mm}$, em relação aos controles pareados (Britto et al., 2011).

Para avaliar os parâmetros microbiológicos e imunológicos da doença periodontal em indivíduos com doença sistêmica, a metodologia adequada é a que faz a comparação entre grupos com o mesmo diagnóstico de doença periodontal, e que diferem apenas pela condição sistêmica (Souto et al., 2014; Ramesh et al., 2013; Anitha et al., 2013; Kalra et al., 2013). Neste estudo, não houve diferença estatística entre os grupos, no diagnóstico da doença periodontal. No entanto, a média de PCS boca toda, conforme dito anteriormente, apresentou diferença estatística entre os grupos. Não foi possível o pareamento pela média de PCS boca toda, já que os indivíduos avaliados foram os mesmos do estudo anterior (Britto et al., 2011).

Para minimizar a possível interferência da PCS boca toda nos achados microbiológicos e imunológicos, foi realizado pareamento das PCS, nos sítios de coleta raso e profundo. A média de NCI apresentou diferença estatística entre os grupos, no sítio de coleta profundo. Este fato possivelmente ocorreu devido à interferência dos valores de retração/hiperplasia no sítio de coleta profundo, que não apresentou diferença estatística entre os grupos. No entanto, quando somados/diminuídos os valores de retração/hiperplasia aos valores de PCS, as médias de NCI apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O grupo que apresentou maior média de PCS, boca toda, também apresentou maior porcentagem de sítios, boca toda, com sangramento à sondagem, diferença estatisticamente significativa. Este dado já foi descrito na literatura (Teles et al., 2012; Farina et al., 2013).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, com relação à porcentagem de sítios com biofilme visível. No entanto, observamos diferença estatística para sangramento à sondagem ($p=0,02$), cálculo supragengival ($p=0,02$) e média de PCS boca toda ($p=0,03$). Embora a literatura mostre relação positiva significativa entre severidade de inflamação gengival e quantidade de depósito de biofilme supragengival, além de quantidade e composição do biofilme subgengival (Armitage et al., 1982; Socransky et al., 1991; Müller, 2009), a variabilidade no sangramento à sondagem, descrita entre indivíduos ou dentro do mesmo indivíduo, não é associada somente a diferenças na quantidade/qualidade do acúmulo de biofilme (Trombelli et al., 2004; 2008). Fatores relacionados ao paciente, como idade e número de bolsas periodontais, além de características específicas do sítio, como PCS, são, também, responsáveis pelas variações no sangramento à sondagem, a nível do indivíduo (Farina et al., 2011).

No presente estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, para as bactérias analisadas, em cada categoria de sítio (raso ou profundo). Isto pode ser explicado pelo pareamento das PCS nos sítios de coleta. No entanto, como o grupo dos indivíduos com IGHD apresentaram maior média de PCS boca toda, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, poderia ocorrer alguma diferença nos níveis dos patógenos avaliados, já que bactérias dos sítios rasos de indivíduos com periodontite podem se originar dos sítios profundos (Riviere et al., 1996).

As espécies bacterianas avaliadas (*T.f*, *T.d*, *P.g* e *A.a*) foram encontradas tanto nas amostras de biofilme subgengival de sítios rasos, quanto nas amostras de biofilme subgengival de sítios profundos, em concordância com a literatura (Riviere et al., 1996). A escolha dos patógenos *T.f*, *A.a*, *P.g* e *T.d* para análise foi feita, já que eles são importantes para o estabelecimento e progressão da destruição periodontal, em casos de periodontites crônica e agressiva (Faveri et al., 2009; Teles et al., 2008; Ximénez-Fyvie et al., 2000). No entanto, a microbiota periodontal é

muito diversa, com mais de 700 microorganismos reconhecidos como seus possíveis integrantes. Destes, em torno de 200 podem estar presentes em um indivíduo e, em torno de 50, em um único sítio (Aas et al., 2005), mostrando envolvimento com a doença periodontal, assim como os microorganismos do complexo vermelho, descrito por Socransky et al., 1998 (Griffen et al., 2012). O ideal seria que tivéssemos traçado o perfil microbiológico de cada indivíduo, abrangendo o maior número possível de espécies envolvidas no processo da doença periodontal.

Mesmo diante de acúmulos de biofilme quantitativamente e/ou qualitativamente similares, é possível que ocorram diferenças significativas na resposta inflamatória em diferentes indivíduos (Trombelli et al., 2004; Trombelli et al., 2005), podendo representar um traço individual (Tatakis; Trombelli, 2004) e este, portanto, ser o componente da predisposição genética à evolução da doença periodontal (Michalowicz et al., 1991). Os fatores de risco genéticos influenciam a história natural da periodontite aumentando a probabilidade de desenvolvimento da mesma e, quando ausentes, reduzindo-a (Hart 1994; Page; Sturdivant, 2002).

Os indivíduos com IGHD avaliados neste estudo pertencem a uma mesma família com a deficiência, devido à alta prevalência de casamentos consangüíneos na região (Salvatori et al., 1999). Trata-se de uma deficiência genética, autossômica recessiva, devido à ocorrência de uma mutação homozigótica no gene do receptor do GHRH (Hayashida et al., 2000; Salvatori et al., 1999, 2001, 2002). Este pode ser um dos motivos que levou os indivíduos com IGHD a apresentarem alteração na resposta inflamatória, com aumento estatisticamente significativo de MMP-8 e CRP no fluido gengival, em sítios profundos, em comparação com os controles. Outras citocinas, como TNF- α e IL-8, em sítios profundos, mostraram uma tendência a aumento em relação aos controles, embora a diferença não tenha dado estatisticamente significativa. Um dos motivos possíveis para que os outros valores não tenham apresentado diferença estatística entre os grupos é o pequeno tamanho da amostra (Schlesselman, 1982). No entanto, este foi o número máximo possível de indivíduos com IGHD e seus respectivos controles, levando em conta os critérios de elegibilidade e participação no estudo.

Ao avaliar a susceptibilidade do hospedeiro à doença periodontal, estudos realizados em uma população holandesa sugeriram que a periodontite tem

caráter familiar (Van der Velden et al., 1989; Petit et al., 1994). Ao investigar a condição periodontal em jovens indonésios irmãos, privados de higiene bucal regular, sugeriram que pode haver a influência genética para a periodontite encontrada (Van der Velden et al., 1993). Estudo realizado com 110 pares de gêmeos adultos, com média de idade de 40 anos, indicou que, entre 38% e 82% das variações na condição periodontal encontradas na população, avaliadas pelo nível clínico de inserção e profundidade clínica de sondagem, podem ser atribuídas a fatores genéticos (Michalowicz et al., 1991). Posteriormente, analisando 117 pares de gêmeos adultos, e incluindo na análise fatores ambientais como fumo e utilização de serviços odontológicos, os autores estimaram que periodontite crônica tem, aproximadamente, 50% do fator genético (Michalowicz et al., 2000).

No presente estudo, no soro, os indivíduos com IGHD apresentaram mais IL-17, com diferença estatisticamente significativa, do que os controles. A ausência de diferença estatística para as outras citocinas também pode ter sido causada pelo pequeno tamanho da amostra. A IL-17, quando associada com periodontite crônica (Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005), atua estimulando células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas a produzirem outros mediadores como IL-1, IL-6, TNF- α (Beklen et al., 2007), IL-8 e Prostaglandinas (Fossiez et al., 1996).

A expressão da IL-6 é associada a aterosclerose (Modur et al., 1997). Os indivíduos com IGHD deste estudo, apesar de apresentarem fatores de risco cardiovasculares inerentes à deficiência do GH, como obesidade abdominal e colesterol total elevado (Aguiar-Oliveira et al., 2010; Gleeson et al., 2007), não apresentaram sinais de aterosclerose, nos estudos já desenvolvidos (Oliveira et al., 2006). A ausência de diferença estatisticamente significativa para IL-6 que observamos no presente estudo, no fluido gengival e no soro, entre os grupos, pode explicar a ausência de sinais de aterosclerose observada por Oliveira et al., 2006.

Outro fator muito importante a ser considerado é a presença da IGHD, desde o nascimento, nos indivíduos deste estudo. Em todos os outros estudos avaliados, poucos indivíduos têm a IGHD desde o nascimento. Grande parte tem a GHD de início na idade adulta (GHD adquirida) (Oliveira et al., 2010). Os indivíduos de Itabaianinha têm níveis extremamente baixos de IGF-I ao longo de toda a vida, enquanto que os indivíduos com a DGH adquirida têm níveis normais de IGF-I, até o

desenvolvimento da GHD, com diminuição posterior dos níveis de IGF-I, raramente a níveis extremamente baixos (Araujo et al., 2012). A exposição (IGHD), nos estudos de Itabaianinha, pode ser acessada com alto nível de precisão, já que se trata de uma exposição genética e ao longo de toda a vida (Salvatori et al., 1999). Este fator foi sugerido como um dos possíveis causadores para as diferenças encontradas, em relação a outros trabalhos na literatura.

Estudos mostram que indivíduos com GHD apresentam aumento na produção de IL-6 e TNF- α pelos monócitos, além de aumento nas concentrações séricas CRP, TNF- α , IL-6 (Serri et al, 1999; Sesmilo et al., 2001) e MMP-9 (Randeva et al., 2004), dados contrários aos nossos resultados. Em Itabaianinha, ao contrário do que a literatura mostra em indivíduos com GHD adquirida (Colao et al., 2001), após 6 meses de tratamento com GH, ocorreu aumento de indivíduos com placas ateroscleróticas (Araujo et al., 2012). Esta diferença, dos indivíduos com IGHG de Itabaianinha para a grande maioria de indivíduos de outros estudos, com GHD adquirida, pode também explicar os resultados que obtivemos divergentes aos da literatura, em relação aos níveis de citocinas encontradas no fluido gengival e no soro.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, para MMP-8 no soro e no fluido gengival, nos sítios rasos, nem para MMP-9 no soro e no fluido gengival, em sítios rasos e profundos. Como níveis aumentados de MMP-8 e MMP-9 foram associados a eventos cardiovasculares, como placa aterosclerótica (Peeters et al., 2011; Müller et al., 2014), esta pode ser uma das explicações para os nossos achados, que não mostraram níveis mais altos desta citocina nos indivíduos com IGHG. Os indivíduos do nosso estudo nunca receberam tratamento com GH e, por este motivo, nunca foram expostos ao fator que levou ao aumento das placas ateroscleróticas.

Entre os grupos do presente estudo, houve diferença estatisticamente significativa para os níveis de CRP, no fluido gengival coletado de sítios profundos. Na presença da doença inflamatória, os indivíduos com IGHG apresentaram aumento deste mediador inflamatório no fluido gengival, o que está em concordância com a literatura (Sanders et al., 2009). No entanto, os níveis de CRP em sítios rasos do fluido gengival e no soro não mostraram diferença estatisticamente significativa

entre os grupos. Adultos, com GHD, apresentam maior risco de mortalidade cardiovascular e cerebrovascular do que o esperado (Bengtsson, 1998; Bulow et al., 2000). Foi proposto que este aumento de risco na mortalidade é influenciado por fatores como obesidade abdominal, colesterol total e níveis de CRP (Gola et al., 2005). De acordo com Oliveira et al., 2006, os indivíduos com IGHD de Itabaianinha apresentaram aumento estatístico significativo nos níveis séricos de CRP, em relação aos controles pareados. No estudo citado, os indivíduos não podiam ter histórico de doença cardiovascular ou outra doença sistêmica. No presente estudo, este fato pode ter influenciado os nossos resultados, já que não teve como critério, durante o pareamento, histórico de doença cardiovascular.

Comparando os sítios rasos e profundos, os indivíduos com IGHD do nosso estudo apresentaram diferença estatisticamente significativa para as citocinas e bactérias do fluido gengival. A única variável que não apresentou diferença estatística entre as categorias de sítio foi *A.a*. Estes dados confirmam os dados da literatura, que mostram que a PCS é um fator que influencia a composição da microbiota subgengival (Socranky; Haffajee, 2005), especialmente as do complexo laranja e vermelho, que aumentam significativamente com o aumento da PCS (Socransky et al., 1991; Ximénez-Fyvie et al., 2000; Colombo et al., 2002). Com o aumento significativo destas bactérias, ocorre aumento da resposta inflamatória (McCauley; Nohutcu, 2002). Como não observamos diferença estatisticamente significativa, entre sítios rasos e profundos, para *A.a*, em ambos os grupos, podemos supor que esta bactéria não esteja envolvida no aumento da resposta inflamatória, de acordo com o aumento da PCS. O mesmo pode ter ocorrido com *P.g*, no grupo controle.

No fluido gengival dos indivíduos com IGHD, foi observada uma forte correlação entre a PCS, no sítio de coleta, e MMP-8, IL-1a, *T.f* e *T.d*. No grupo teste, foi observada correlação forte entre a PCS, no sítio de coleta, e MMP-9, MMP-8, IL-6, IL-8, IL-1a, *T.f* e *T.d*. Estes achados nos levam a inferir que, nos dois grupos, a PCS influencia, ou é influenciada, diretamente, por estas citocinas e bactérias periodontopatogênicas. Podem existir outras citocinas e outras bactérias, que não foram avaliadas neste estudo, que possam ter influenciado, ou terem sido influenciadas, diretamente, pela PCS do sítio de coleta.

O desenho transversal do estudo dificulta a interpretação dos dados, visto que as diferenças imunológicas e microbiológicas podem ter influência temporal. Além disso, também é possível que outras variáveis envolvidas nos mecanismos da doença periodontal e da IGHD, envolvendo mediadores imunológicos e espécies subgengivais, não tenham sido avaliadas no presente estudo.

Clinicamente, não observamos alterações dentárias e/ou teciduais que pudessem ter sido resultantes da influência da IGHD e que, supostamente, pudessem influenciar na doença periodontal encontrada. É importante que outros estudos sejam realizados nestes indivíduos, para entender os possíveis mecanismos da associação entre a IGHD e a doença periodontal.

Os resultados deste trabalho nos indicam que pacientes com algum nível de deficiência do GH necessitam de visitas mais freqüentes ao periodontista, com controle e manutenção periodontal mais rigoroso, para prevenir o surgimento da doença periodontal nos mesmos, que podem ter resposta inflamatória mais exacerbada e, conseqüentemente, uma destruição periodontal maior.

7 CONCLUSÕES

Mesmo com um perfil microbiológico semelhante, indivíduos com a IGHD apresentam alterações imunológicas moderadas (aumento de IL-17 no soro e de MMP-8 e Proteína C-Reativa no fluido gengival coletado de sítios profundos), comparados aos controles.

REFERÊNCIAS⁶

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721-32.

Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, de A Barretto ES, Alcântara MR, Miraki-Moud F, Menezes CA, Souza AH, Martinelli CE, Pereira FA, Salvatori R, Levine MA, Shalet SM, Camacho-Hubner C, Clayton PE. Effect of growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:4118-26.

Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RMC, Oliveira CR, Blackford A, Valença EH, Santos EG, Gois-Junior MB, Meneguz-Moreno RA, Araujo VP, Oliveira-Neto LA, Almeida RP, Santos MA, Farias NT, Silveira DC, Cabral GW, Calazans FR, Seabra JD, Lopes TF, Rodrigues EO, Porto LA, Oliveira IP, Melo EV, Martari M, Salvatori R. Longevity in Untreated Congenital Growth Hormone Deficiency Due to a Homozygous Mutation in the GHRH Receptor Gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:714-21.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25:229-35.

Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J Clin Periodontol*. 1997;24:830–5.

Andiran N, Yordam N. TNF- alpha levels in children with growth hormone deficiency and the effect of long-term growth hormone replacement therapy. *Growth Hormone & IGF Research*. 2007;17(2):149-53.

Anitha G, Nagaraj M, Jayashree A. Comparative evaluation of levels of C-reactive protein and PMN in periodontitis patients related to cardiovascular disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 May;17(3):330-2.

Araujo VP, Aguiar-Oliveira MH, Oliveira JL, Rocha HM, Oliveira CR, Rodrigues TM, Nunes MA, Britto IM, Ximenes R, Barreto-Filho JA, Meneguz-Moreno RA, Pereira RM, Valença EH, Oliveira-Neto LA, Vicente TA, Blackford A, Salvatori R. Arrest of atherosclerosis progression after interruption of GH replacement in adults with congenital isolated GH deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2012 Jun;166(6):977-82.

⁶ De acordo com Estilo Vancouver

Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *Journal of Periodontology* 1982; 53: 550–6.

Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):37-215.

Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4 (1):1-6.

Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, Stalla GK. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*. 1999 Jan;20(1):71-95.

Beck JD, Löe H. Epidemiological principles in studying periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1993;2:34-45.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007;86(4):347–51.

Bengtsson BA. Untreated growth hormone deficiency explains premature mortality in patients with hypopituitarism. *Growth Horm IGF Res*. 1998;8 Suppl A:77-80.

Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system, *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998; 9:259–75.

Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6):87-107.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993; 28: 500-10.

Boguszewski, CL. Genética molecular do eixo GH–IGF-I. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001;45(1):5-14.

Bozzola M, Maccario R, Cisternino M, De Amici M, Valtorta A, Moretta A, Biscaldi I, Schimpff RM. Immunological and endocrinological response to growth hormone therapy in short children. *Acta Paediatr Scand* 1988;77: 675.

Britto IMPA, Aguiar-Oliveira MH, Oliveira-Neto LA, Salvatori R, Souza AHO, Araujo VP, Corraini P, Pannuti CM, Romito GA, Pustiglioni FE. Periodontal disease in adults with untreated congenital growth hormone deficiency: a case-control study. *J Clin Periodontol* 2011; 38:525-31.

Buhlin K, Guastafsson A, Pockley AG, Frostegard J, Klinge B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J* 2003;24:2099–107.

Bülow B, Hagmar L, Eskilsson J, Erfurth EM. Hypopituitary females have a high incidence of cardiovascular morbidity and an increased prevalence of cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):574-84.

Carroll PV, Christ ER, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, Clemmons D, Hintz R, Ho K, Laron Z, Sizonenko P, Sönksen PH, Tanaka T, Thorne M. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. Growth Hormone Research Society Scientific Committee. *J Clin Endocrinol Metab*.1998;83(2):382-95.

Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Inflammation* 2009; 32: 130-7.

Chokwiriyaichit A1, Dasanayake AP, Suwannarong W, Hormdee D, Sumanonta G, Prasertchareonsuk W, Wara-Aswapati N, Combellick J, Pitiphat W. Periodontitis and gestational diabetes mellitus in non-smoking females. *J Periodontol*. 2013;84(7):857-62.

Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci*. 1983;12:III-VII, 1-152.

Clark R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev*. 1997;18:157-79.

Colao A, di Somma C, Cuocolo A, Spinelli L, Tedesco N, Pivonello R, Bonaduce D, Salvatore M, Lombardi G. Improved cardiovascular risk factors and cardiac performance after 12 months of growth hormone (GH) replacement in young adult patients with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(5):1874-81.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73(4):360-9.

Dahlén G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Putative periodontopathogens in “diseased” and “non-diseased” persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol.* 1992;19:35-42.

Dahlén, G, Luan W-M, Baelum V, Fejerskov O, Chen X. Periodontopathogens in elderly Chinese with different periodontal disease experience. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:188–200.

Deepak D, Daousi C, Javadpour M, Clark D, Perry Y, Pinkney J, Macfarlane IA. The influence of growth hormone replacement on peripheral inflammatory and cardiovascular risk markers in adults with severe growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res.* 2010 Jun;20(3):220-5.

Ebersole JL, Cappelli D. Acute phase reaction in infection and inflammatory diseases. *Periodontology* 2000 1984;23:19-49.

Edwards CK, Lorence RM, Dunham DM, Arkins S, Yunger LM, Greager JA, Walter RJ, Dantzer R, Kelley KW. Hypophysectomy inhibits the synthesis of tumor necrosis factor α by rat macrophages: partial restoration by exogenous growth hormone or interferon- γ . *Endocrinology.* 1991;128:989-96.

Farina R, Scapoli C, Carrieri A, Guarnelli ME, Trombelli L. Prevalence of bleeding on probing: a cohort study in a specialist periodontal clinic. *Quintessence Int.* 2011;42(1):57-68.

Farina R, Guarnelli ME, Figuero E, Herrera D, Sanz M, Trombelli L. Farina R, Tomasi C, Trombelli L. The bleeding site: a multi-level analysis of associated factors. *J Clin Periodontol.* 2013 Aug;40(8):735-42.

Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. *Harrison: Medicina Interna.* 1998;14(2):2091-120.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(9):739-49.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P et al. T cell interleukin- 17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 1996;183(6): 2593–2603.

Geffner ME, Bersch N, Lippe BM, Rosenfeld RG, Hintz RL, Golde DW. Growth hormone mediates the growth of T-lymphoblast cell line *via* locally generated insulin-like growth factor I. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71: 464.

Gemmell E1, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997; 14:112-43.

Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63(4 Suppl):338-55.

Gleeson H, Barreto ES, Salvatori R, Costa L, Oliveira CR, Pereira RM, Clayton P, Aguiar-Oliveira MH. Metabolic effects of growth hormone (GH) replacement in children and adolescents with severe isolated GH deficiency due to a GHRH receptor mutation. *Clin Endocrinol* 2007;66(4):466-74.

Gola M, Bonadonna S, Doga M, Mazziotti G, Giustina A. Cardiovascular risk in aging and obesity: is there a role for GH. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(8):759-67.

Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol* 2000. 2003;31:43-54

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008;79(8):1585-91.

Greenspan FS, Strewler GJ. *Basic and Clinical Endocrinology*. London: Appleton Lange; 1997.

Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012 Jun;6(6):1176-85.

Griffiths, GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:32-42.

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Subgingival micro- biota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 346–53.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal

diseases. In: Socransky, S. S. & Haffajee, A. D.: Microbiology and immunology of periodontal diseases. Periodontology 2000 1994; 5: 78–111.

Haffajee AD, Socransky SS. The bacterial ethiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992; 63: 322-31.

Hart TC. Genetic considerations of risk in human periodontal disease. Curr Opin Periodontol. 1994;3-11.

Hayashida CY, Gondo RG, Ferrari C, Toledo SP, Salvatori R, Levine MA, Ezabella MC, Abelin N, Gianella-Neto D, Wajchenberg BL. Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaianinha. Eur J Endocrinol. 2000;142(6):557-63.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. Genes Dev. 1996;10:1580-94.

Kalra N, Pradeep AR, Priyanka N, Kumari M. Association of stem cell factor and high-sensitivity C reactive protein concentrations in crevicular fluid and serum in patients with chronic periodontitis with and without type 2 diabetes. J Oral Sci. 2013;55(1):57-62.

Kalra N, Pradeep AR, Priyanka N, Kumari M. Association of stem cell factor and high-sensitivity C reactive protein concentrations in crevicular fluid and serum in patients with chronic periodontitis with and without type 2 diabetes. J Oral Sci. 2013 Mar;55(1):57-62.

Kargi AY1, Merriam GR. Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in adults. Nat Rev Endocrinol. 2013 Jun;9(6):335-45.

Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein hormones and immunity. Brain, Behavior, and Immunity 2007;21:384–92.

Kiess W, Doerr H, Eisl E, Butenandt O, Belohradsky BH. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in growth hormone deficiency. N Engl J Med. 1986;314-21.

Kimata H, Yoshida A. Differential effect of growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor II, and insulin on Ig production and growth on human

plasma cells. *Blood* 1994;83:1569.

Kumari M, Pradeep A, Priyanka N, Kalra N, Naik SB. Crevicular and serum levels of monocyte chemoattractant protein-4 and high-sensitivity C-reactive protein in periodontal health and disease. *Arch Oral Biol.* 2014;59(6):645-53.

Leonsson M, Hulthe J, Johannsson G, Wiklund O, Wikstrand J, Bengtsson BA, Oscarsson J. Increased interleukin-6 levels in pituitary-deficient patients are independently related to their carotid intima-media thickness. *Clin Endocrinol.* 2003;59:242-50.

Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: Growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr.* 1994; 125:29-35.

Lobie PE, Barnard R, Waters MJ. The nuclear growth hormone receptor binding protein. Antigenic and physiochemical characterization. *J Biol Chem.* 1991;266: 22645-52.

Lobie PE, Wood TJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt. Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269: 31735-46.

López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71(6): 948-54.

Lynch AM, Kapila RO. Overwhelming postsplenectomy infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1996;10(4):693-707.

Maheshwari HG, Silverman BL, Dupuis J, Baumann G. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov;83(11):4065-74.

McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol.* 2002;73(11):1377-91.

Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Pihlstrom BL. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* 1991;62(5):293-9.

Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(11):1699-707.

Microbiological profile and calprotectin expression in naturally occurring and experimentally induced gingivitis. *Clin Oral Investig*. 2012;16(5):1475-84.

Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest*. 1997;100(1):158-68.

Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Microbiology and immunology of periodontal diseases*. *Periodontology* 2000.1994; 5: 66–77.

Morrhaye G, Kermani H, Legros JJ. Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *PLOS One*. 2009;4(5):5668.

Mukherjee A1, Helbert M, Davis J, Shalet S. Immune function in hypopituitarism: time to reconsider? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Oct;73(4):425-31
Müller HP. Multilevel modeling of gingival bleeding on probing in young adult carriers of non-JP2-like strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Clinical Oral Investigations* 2009; 13:171–8.

Müller A, Krämer SD, Meletta R, Beck K, Selivanova SV, Rancic Z, Kaufmann PA, Vos B5, Meding J, Stellfeld T, Heinrich TK, Bauser M, Hütter J, Dinkelborg LM, Schibli R, Ametamey SM. Gene expression levels of matrix metalloproteinases in human atherosclerotic plaques and evaluation of radiolabeled inhibitors as imaging agents for plaque vulnerability. *Nucl Med Biol*. 2014 Apr 21. [Epub ahead of print]

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72:1221– 7.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of Periodontology* 1996;1:821–78.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:248-66.

Oliveira CR1, Salvatori R, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Pereira RM, Valença EH, Araujo VP, Farias NT, Silveira DC, Vieira JG, Barreto-Filho JA. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;95(2):693-8.

Oliveira CRP, Salvatori R, Nobrega LMA. Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Clin Endocrinol*. 2008;69(1):153-8.

Oliveira JLM, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes Filho R, de Oliveira Britto AV, Oliveira Souza AH, Prado CM, Pereira Oliveira CR, Pereira RM, Ribeiro Vicente Tde A, Farias CT, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone (GH) deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2093-9.

Oliver RC, Holm-Pederen P, Løe H. The correlation between clinical scoring, exudate measurements and microscopic evaluation of inflammation in the gingiva. *J Periodontol*. 1969;40(4):201-9.

Oztekin G, Baser U, Kucukcoskun M, Tanrikulu-Kucuk S, Ademoglu E, Isik G, Ozkan G, Yalcin F, Kiyani E. The Association between Periodontal Disease and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Case Control Study. *COPD*. 2013 Dec 30. [Epub ahead of print]

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997; 14:9-11.

Page RC, Sturdivant EC. Noninflammatory destructive periodontal disease (NDPD). *Periodontol 2000*. 2002;30:24-39.

Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, Turner DW. Salivary levels of alpha 2- macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1995;40:1151– 5.

Peeters W, Moll FL, Vink A, van der Spek PJ, de Kleijn DP, de Vries JP, Verheijen JH, Newby AC, Pasterkamp G. Collagenase matrix metalloproteinase-8 expressed in atherosclerotic carotid plaques is associated with systemic cardiovascular outcome. *Eur Heart J*. 2011;32(18):2314-25.

Petit MD, Van Steenberg TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1994;21(2):76-85.

Philips JA III, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis on familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci*. 1981;78:6372-5.

Rajkarnikar J, Thomas BS, Rao SK. Inter- relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Kathmandu Univ Med J*. 2013;11(41):22-6.

Ramesh A, Thomas B, Rao A. Evaluation of the association between chronic periodontitis and acute coronary syndrome: A case control study. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 Mar;17(2):210-3.

Randeva HS, Lewandowski KC, Komorowski J, Murray RD, O'Callaghan CJ, Hillhouse EW, Stepien H, Shalet SM. Growth hormone replacement decreases plasma levels of matrix metalloproteinases (2 and 9) and vascular endothelial growth factor in growth hormone-deficient individuals. *Circulation* 2004;25;109(20):2405-10.

Rapaport R, Sills IN, Green L, Barrett P, Labus J, Skuza KA, Chartoff A, Goode L, Stene M, Petersen BH. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2612-9.

Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol*. 1996; 67:109-115.

Salvatori R, Fan X, Phillips JA, Espigares-Martin R, Martin de Lara I, Freeman KL, Plotnick L, Al-Ashwal A, Levine MA. Three new mutations in the gene for the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type IB. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:273-9.

Salvatori R, Fan X, Veldhuis JD, Couch R. Serum GH response to pharmacological stimuli and physical exercise in two siblings with two new inactivating mutations in the GH-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(5):591-6.

Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips III JA, Souza AHO, Gondo RG, Toledo SPA, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, Baumann G, Levine MA. Familial dwarfism due to a novel mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):917-23.

Sanders AE, Slade GD, Fitzsimmons TR, Bartold PM. Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:388–95.

Sanders AE, Slade GD, Fitzsimmons TR, Bartold PM. Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):388-95.

Sanz M, van Winkelhoff AJ. Working group 1 of seventh European Workshop on Periodontology. Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the seventh European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38(Suppl. 11):3–6.

Schlesselman J. Case-control studies: design, conduct, analysis. New York: Oxford University Press; 1982.

Serri O, St-Jacques P, Sartippour, M, Renier G. Alterations of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: effect of substitute GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:58-63.

Serri O, St-Jacques P, Sartippour, M, Renier G. Alterations of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: effect of substitute GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:58-63.

Sesmilo G, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N, Klibanski A. Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk makers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. *Ann Intern Med*. 2000;133(2):111-22.

Sesmilo G1, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N, Klibanski A. Effects of growth hormone (GH) administration on homocyst(e)ine levels in men with GH deficiency: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1518-24.

Shrout P, Fleiss J. Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86:420-8.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000.2005;38:135-87.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:134-44

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*. 1991;18(10):766-75.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 260-8.

Socransky, SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *Journal of Clinical Periodontology* 1991; 18: 766–75.

Sorsa T, Tjäderhane L, Kontinen YT, *et al*: Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306-21.

Souto GR, Queiroz-Junior CM, Costa FO, Mesquita RA2moking effect on chemokines of the human chronic periodontitis. *Immunobiology*. 2014 [Epub ahead of print]

Souza AHO. Estudo das crianças de Carretéis – deficiência familiar isolada do hormônio do crescimento. Dissertação. Mestrado em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, 1997.

Souza AHO. Growth or somatotrophic hormone : new perspectives in isolated GH deficiency after description of the mutation in the GHRH receptor gene in individuals of Itabaianinha county, Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(3).

Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73(4):360-9.

Susin C. Periodontal diseases in a representative urban population in south Brazil. [Doctor Odontologiae Thesis]. Norway Bergen: University of Bergen; 2004.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S, “The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease,” *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32(4):369–374.

Tanner A, Kent R, Maiden MFJ, Taubman MA. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Period Res.* 1996; 31:195–204.

Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol.* 2004;31(4):229-38.

Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:125-35.

Teles FR, Teles RP, Martin L, Socransky SS, Haffajee AD. Relationships among interleukin-6, tumor necrosis factor- α , adipokines, vitamin D, and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2012;83(9):1183-91.

Teles RP, Patel M, Socransky SS, Haffajee AD. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol.* 2008;79(5):784-94.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26:S4-S20.

Thorner MO, Vance ML, Laws Jr ER, Horvalth E, Kovacs K. The anterior pituitary gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Textbook of Endocrinology.* 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1992:221-310.

Trombelli L, Farina R, Minenna L, Carrieri A, Scapoli C, Tatakis DN. Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35:955–60.

Trombelli L, Scapoli C, Tatakis DN, Grassi L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *J Clin Periodontol.* 2005;32(11):1143-50.

Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of “high-responder” and “low-responder” subjects. *Journal of Clinical Periodontology* 2004; 31: 239–52.

Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice

fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:77-104.

Van der Velden U, Abbas F, Van Steenberghe TJ, De Zoete OJ, Hesse M, De Ruyter C, De Laat VH, De Graaff J. Prevalence of periodontal breakdown in adolescents and presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subjects with attachment loss. *J Periodontol*. 1989;60(11):604-10.

Van der Velden U¹, Abbas F, Armand S, de Graaff J, Timmerman MF, Van der Weijden GA, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *J Clin Periodontol*. 1993;20(9):683-90.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32(4):383–9.

Vidal F, Cordovil I, Figueredo CM, Fischer RG. Non-surgical periodontal treatment reduces cardiovascular risk in refractory hypertensive patients: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2013 Jul;40(7):681-7.

Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EH, Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *J Br Med*. 1977;2:427-30.

Waters MJ, Lobie PE, Gobius KS, Rowlinson SW, Garcia-Aragon J, Zhang CZ, Young WG, Bastiras S, Robins A, Wells JR, Barnard R. Growth hormone receptors-recent developments. *Proc Endocr Soc Austr*. 1991;34:145-9.

Waters MJ. The GH receptor. In: Kostyo JL editor. *Handbook of Physiology*. Oxford; Oxford University Press: 1999. chapt 14

World Health Organization. *Oral health surveys: basic methods*. 4th ed. Geneva: OMS; 1997.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(9):648-57.

Yazdi FK, Karimi N, Rasouli M, Roozbeh J. Effect of nonsurgical periodontal treatment on C-reactive protein levels in maintenance hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2013;35(5):711-7.

Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H. Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum. *J Bone Miner Res.* 1992;18:187-98.

Yoshida A, Ishioka C, Kimata H, Mikawa H. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free media. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;126:534.

Young WG, Ruch JV, Stevens MR, Begue-Kirn C, Zhang CZ, Lesot H, Waters MJ. Comparison of the effects of GH, IGF-1 and fetal calf serum on mouse molar odontogenesis *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 1995;40:789-99.

Young WG, Zhang CZ, Li H, Lobie PE, Waters MJ. A bromodeoxyuridine immunocytochemical and morphometric study of the influence of GH on cell proliferation in odontogenic mesenchyme of the Lewis dwarf rat. *Arch Oral Biol.* 1993;38:207-14

Young WG, Zhang CZ, Li H, Osborne P, Waters MJ. The influence of GH on cell proliferation in odontogenic epithelia by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and morphometry: a study in the Lewis dwarf rat. *J Dent Res.* 1992;71:1807-11.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood.* 2007;109(9):3794-802.

Zambon JJ. Periodontal Diseases: Microbial factors. *Annals of Periodontology* 1996; 1: 879–925.

Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C, Waters, MJ. Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors.* 1997;14:131-43.

Zhang CZ, Young WG, Li H, Garcia-Aragon J, Clayden AM, Waters MJ. Expression of growth hormone receptor by immunocytochemistry in rat molar root formation and alveolar bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1992;50:541-6.

Zhou SY, Duan XQ, Hu R, Ouyang XY. Effect of non-surgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease. *Chin J Dent Res.* 2013;16(2):145-51.

Periodontal disease in adults with untreated congenital growth hormone deficiency: a case–control study

Isabella M. P. Araujo Britto¹, Manuel H. Aguiar-Oliveira², Luiz A. Oliveira-Neto², Roberto Salvatori³, Anita H. Oliveira Souza², Vanessa Porto Araujo², Priscila Corraini^{1,4}, Claudio Mendes Pannuti¹, Giuseppe Alexandre Romito¹, Francisco Emílio Pustiglioni¹

¹Department of Stomatology, Division of Periodontics, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Division of Endocrinology, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil; ³Division of Endocrinology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁴Department of Periodontology, School of Dentistry, University of Århus, Århus, Denmark

Britto IMPA, Aguiar-Oliveira MH, Oliveira-Neto LA, Salvatori R, Souza AHO, Araujo VP, Corraini P, Pannuti CM, Romito GA, Pustiglioni FE: Periodontal disease in adults with untreated congenital growth hormone deficiency: a case–control study. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 525–531. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01721.x.

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the possible associations between isolated growth hormone deficiency (IGHD) and periodontal attachment loss (PAL) in adults affected by congenital IGHD.

Materials and methods: Forty-five previously identified IGHD subjects were eligible for this study. The final study sample comprised 32 cases (gender:20M/12F; age:44.8 ± 17.5) matched for age, gender, diabetes, smoking status and income to 32 controls (non-IGHD subjects). Participants were submitted to a full-mouth clinical examination of six sites per tooth and were interviewed using a structured, written questionnaire. Periodontitis was defined as proximal PAL ≥ 5 mm affecting ≥ 30% of teeth.

Results: No significant differences were observed in the percentage of sites with visible plaque between IGHD and non-IGHD subjects (59.4% versus 46.9%, $p = 0.32$). IGHD subjects had significant less supragingival calculus (31.3% versus 59.4%, $p = 0.02$) and more bleeding on probing (71.9% versus 18.8%, $p < 0.01$) than controls. PAL ≥ 5 mm was significantly more prevalent (100% versus 71.9%, $p < 0.01$) and affected more teeth (30.5% versus 6.7%, $p < 0.01$) in cases than in controls. After adjusting for supragingival calculus, IGHD cases had a higher likelihood of having periodontitis than controls (OR = 17.4–17.8, 95% CI = 2.3–134.9, $p = 0.004$ –0.005).

Conclusion: Congenital IGHD subjects have a greater chance of having PAL.

Key words: dwarfism; endocrinology; growth hormone; periodontal attachment loss; periodontitis

Accepted for publication 24 February 2011

Growth hormone (GH) has a fundamental role in postnatal growth, thereby increasing survival capacity, as proper growth

provides an adult body that is able to work and reproduce. In addition to stimulating body growth, GH plays an important role in body metabolism and composition, cardiovascular and bone status (Brixen et al. 1995, Carrol & Christ 1998).

In the embryonic tooth development of the rat, GH, GH-binding protein and GH receptor (GHR) are expressed in odontogenic cells that are undergoing morpho-differentiation, histo-differentiation and dentinogenesis (Zhang et al. 1997). GHR's have also been detected in periodontal tissues, influencing cell differentia-

tion and function during root formation, and establishment of the periodontal ligament (Zhang et al. 1992). Animal studies have shown that GH increases the formation of hard tissues in vivo in bone (Rosen et al. 1995), dentine (Young et al. 1993), enamel (Young et al. 1992) and cementum (Clayden et al. 1994). Rats given daily injections of GH for several months develop molar tooth hypercementosis (Becks et al. 1948). Furthermore, GH possesses important immune-regulatory functions (Clark 1997) that may influence chronic inflammatory responses. Indeed,

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was funded by FAPESP (State of São Paulo foundation for research support), grant number 08/56712-0, and by the Foundation for Post-Graduate Education (CAPES).

GH deficiency (GHD) has been associated with defective antibody and cell-mediated immunity (Kiess et al. 1986, Edwards et al. 1991).

Isolated growth hormone deficiency (IGHD) is a rare disease (1/3480 to 1/10,000 live births) (Vimpani et al. 1977, Lindsay et al. 1994) characterized by proportional post-natal growth retardation, doll facies, a high-pitched voice and central obesity (Aguar-Oliveira et al. 2010). Most IGHD subjects in developed countries are treated with GH therapy during childhood (Juil et al. 1997). Therefore, collecting a cohort of individuals with untreated unequivocal severe IGHD to assess the periodontal impact of IGHD in humans is a difficult task. In a low socio-economic status population in northeastern Brazil, we have identified a large extended kindred with IGHD due to a homozygous *null* mutation (IVS1+1G → A) in the GHRH receptor (GHRHR) gene (*GHRHR*). These IGHD subjects have severe short stature and very low serum GH and IGF-I levels throughout life (Aguar-Oliveira et al. 1999, Salvatori et al. 1999). Most adult subjects have never been treated with GH. This study investigates the possible associations between IGHD and periodontal attachment loss (PAL) in these adults affected by congenital IGHD.

Materials and Methods

Study population and design

The study population was identified in a large extended IGHD pedigree we have previously drafted. This includes 105 subjects (over seven generations) in a total population of 32,000 (Salvatori et al. 1999), residing in Itabaianinha county, in the northeastern Brazilian state of Sergipe. Farming, pottery making, handcraft and small business are their main activities in this area. The spread of the mutation in this area was facilitated by the limited population mobility, and the high prevalence of consanguineous marriages (21.7% of 322 unions examined) (Salvatori et al. 1999). From the 105 subjects detected in the original pedigree in 1999 (Salvatori et al. 1999), the full names of 75 were identified. Of these, 53 were still alive (Aguar-Oliveira et al. 2010). Some subjects ($n=4$) could not be traced. Exclusion criteria were age <18 years ($n=4$), being edentulous ($n=5$) and having previously received periodontal treatment and/or GH replacement ($n=8$).

Fig. 1. Flowchart describing the sampling strategy used.

Therefore, from the 49 IGHD subjects who were contacted, the final eligible study sample comprised 32 subjects (20 males and 12 females) (Fig. 1). Thirty-two non-IGHD subjects from Itabaianinha were matched by age (± 5 years), gender, monthly income, diabetes and smoking status [for current smokers: duration of current smoking (± 5 years) and the number of items (cigarettes) smoked on a daily basis (± 10); for former smokers: how many years they had smoked (± 5 years), how many years since stopping smoking (± 5 years) and the number of items (cigarettes) smoked on a daily basis (± 10)]. Potentially eligible controls were selected at the same time as the cases using a neighbourhood approach (expecting that both cases and controls were representative of similar living conditions) (Miettinen 1985).

When a potential IGHD case was contacted by telephone or in person for an interview (through data provided by the medical group), she/he was asked to identify neighbours (known for a long time) with approximately the same demographic characteristics. Of these neighbours, two or three were sorted and contacted. If they fit the eligibility criteria and matched characteristics (age, gender, socio-economic condition assessed by monthly income, diabetes and smoking status), they were invited to participate in the study. Based on the strict matching procedures (including several matching characteristics) and the eligibility criteria, some of the sub-

jects were examined (to provide dental care, if needed) but were not included in the study as control subjects. Finally, 32 non-IGHD subjects from Itabaianinha comprised the control group.

Data collection

Demographic, anthropometric and biochemical data

The fieldwork was conducted between June 2009 and January 2010. All eligible and consenting subjects were invited to participate in an interview performed by a trained dental assistant based on a structured written questionnaire tested in another Brazilian population with similar socio-economic status characteristics (Corraini et al. 2008). The following information was collected: age (in years), gender, occupation, address, household size, income (yes/no) and, if applicable, its approximate monthly amount in Brazilian Reals. Subjects were also asked whether they could read and write (yes/no), how many years of education they had received and whether they had ever received dental treatment (yes/no), and the frequency of tooth cleaning. Current smoking status (yes/no), former smoking status (yes/no), the duration of current and former smoking (in years), time since cessation for former smokers (in years), the type of tobacco-containing items used and the number of items smoked on a daily basis for current and former smokers

were also collected. Height was measured using a portable stadiometer (Portable stadiometer, Welmy Indústria e Comércio Ltda, Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo, Brazil), with subjects standing on the centre of the base with the back to the stadiometer. A portable weighing scale (Portable weighing scale, Filizola S.A. Pesagem e Automação, São Paulo, Brazil) was used to measure their weight. All individuals underwent fasting morning glucose check. The diagnosis of diabetes mellitus was established if the glucose value was >126 mg/dl (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003) (Accu-Chek Active, Roche, Brazil).

Clinical Data

The clinical examinations were carried out by a single trained periodontal specialist (I. B.) assisted by a recorder (L. A. O. N.). All clinical examinations were performed under field conditions. Most of them were conducted in the Dwarves Association building and some were conducted in the subjects' homes, always using a Portable Dental Doctor's Office (Consultant, Rio de Janeiro, Brazil). Probing depth (PD) was measured as the distance (in millimetres) from the free gingival margin to the bottom of the pocket; bleeding on probing (BOP) was recorded as present if bleeding occurred within 15 s after the assessment of PD; and gingival recession (GR) was measured as the distance from the cemento-enamel junction to the free gingival margin. All parameters were determined at six sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, distobuccal, disto-lingual, mid-lingual and mesio-lingual) in all permanent teeth, excluding third molars, using a mouth mirror (Mirror #5, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and a manual periodontal probe (PCPUNC-15, Hu-Friedy) positioned parallel to the long axis of each tooth. The measurements were rounded to the lowest whole millimetre. When the cemento-enamel junction was located apical to the free gingival margin, it was recorded as a negative value.

PAL was calculated as the sum of the PD and GR values for each site. Two sites per tooth (mid-buccal and mid-lingual) were assessed for the presence of visible plaque (yes/no) and supragingival calculus (yes/no). Supragingival calculus was defined as calcified deposits located on exposed crowns and root surfaces extending up to 1 mm below the free gingival margin. Exces-

sive amounts of supragingival calculus compromising the assessment of the periodontal conditions were removed using periodontal curettes (Gracey curettes 5/6, 11/12, 13/14 Hu-Friedy) before probing.

Measurement reproducibility

The interview questions were tested before the survey through a pre-test comprising eight inhabitants from Itabaianinha county. We tested them in IGHD individuals who had previously received a 2-year treatment with GH completed 10 years before this study (and, therefore, could not be part of the study). The questionnaire was then refined to use a more adequate language. Standardization procedures were used by the interviewer to ensure better consistency of the data obtained (Corraini et al. 2008), including similarity regarding information elicited for cases and controls.

The clinical examiner (I. B.) was trained and calibrated in the clinical examinations 15 days before and 4 months after the beginning of the study. The training and the intraexaminer reproducibility assessments were carried out under the same field conditions as those used in all clinical examinations. Intraexaminer reproducibility of PD and PAL was assessed by double recordings of two contra lateral quadrants in four subjects. The repeat recordings were made 7 days after the first clinical examination. The intraclass correlation coefficients for PD and PAL at the site level were 0.94 and 0.97, respectively, and ranged between 0.93 and 0.96 for PD and between 0.96 and 0.97 for PAL.

Data analysis

The purpose of the statistical analyses was to study the association between PAL and IGHD. Furthermore, the prevalence (of IGHD and controls) was described for $PAL \geq 5$ mm, ≥ 7 mm and for 30% of teeth with proximal $PAL \geq 5$ mm. Extent, defined as the percentage of sites affected per person, was also described for $PAL \geq 5$ mm, ≥ 7 mm. Other matched and unmatched demographical, behavioural and clinical characteristics were also described among cases and non-cases. Differences in the means and proportions between groups were analysed using paired Student's *t*-test and the McNemar test, respectively.

To explore and quantify the association between untreated IGHD and PAL, a series of conditional logistic regression analyses (Hosmer & Lemeshow, 2000) were carried out using the procedure clogit in a statistical package (STATA version 10.0 for Windows, Stata, College Station, TX, USA). For this purpose, the group variable 'pair' was created in order to assume that subject outcomes are independent within matched strata. Two periodontal outcomes were considered: the prevalence of 30% of teeth with proximal $PAL \geq 5$ mm (Tonetti & Claffey 2005) and the presence of one or more sites with $PAL \geq 7$ mm. Regarding the inclusion of independent variables, all the matched variables in the design were treated as potential confounders; hence, if a factor for which control affected the outcome estimates in prior univariate χ^2 -tests at an important degree (significant at $p \leq 0.25$), this variable was considered as an independent variable in the multiple model (Rothman et al. 2008). The independent variables considered for inclusion in the conditional logistic regression analysis included: IGHD status (yes/no), years of education (≤ 5 / > 5 years), household size (< 4 people/ ≥ 4 people), subjects who were ever treated by a dentist (yes/no), or ever received oral healthy instructions (yes/no), and percentage sites with supragingival calculus ($\leq 25\%$ / $> 25\%$). All independent variables associated with the outcome at $p \leq 0.25$, as evidenced in a univariate logistic regression analysis (Hosmer & Lemeshow 2000), were included in the full model. A variable was considered a confounder if its removal from the model resulted in changes in the β -estimates $> 10\%$.

Ethical considerations

Permission to carry out this study was obtained from both the IRB's of the Federal University of Sergipe and of the University of São Paulo and the Itabaianinha Dwarves Association. All subjects who agreed to participate signed a written informed consent.

Results

Subject characteristics

All the IGHD subjects contacted answered the structured questionnaire and received the full-mouth clinical examination. When a control could not

be contacted or was not willing to participate, the next living neighbour was sorted and contacted.

Table 1 describes the demographic and behavioural characteristics of cases and controls. By definition, the age, gender, smoking habits and diabetes status did not differ between the groups. Years of education, household size, ever being treated by a dentist and ever receiving oral health instructions were also similar between the groups. As expected, the mean height and weight of IGHD subjects were significantly lower than controls.

Clinical characteristics

The mean number of teeth was similar in the two groups (Table 2). Figure 2 shows the cumulative frequency distributions of PAL ≥ 5 mm (Fig. 2a) and ≥ 7 mm (Fig. 2b), in the two groups. A trend towards an increase of sites recorded with PAL ≥ 5 and ≥ 7 mm could be observed, with differences in grouping (IGHD and controls).

When compared with controls, IGHD presented the same amount of visible plaque ($p = 0.32$), significantly less amount of supragingival calculus ($p = 0.02$) and more BOP ($p < 0.01$). PAL prevalence ≥ 5 mm, ≥ 7 mm and of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm was higher in the IGHD group than in the control group ($p = 0.0012$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively), and 24 and 25 out of 32 IGHD cases, and six and four out of 32 controls were diagnosed with periodontitis (PAL ≥ 5 mm in $\geq 30\%$ teeth and PAL ≥ 7 mm in one or more sites, respectively) (Table 2).

In the univariate analyses, none of the matched variables in the design affected the outcome estimates in prior univariate χ^2 -tests to a significant degree (significant at $p \leq 0.25$). Regarding the unmatched variables, the independent variables included in the multiple models were percentage of sites presenting supragingival calculus ($p = 0.04$ and $p = 0.12$) for the prevalence of PAL ≥ 7 mm and the prevalence of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm, respectively; household size ($p = 0.12$); and subjects who were ever treated by a dentist ($p = 0.18$) for the prevalence of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm (Table 3). Table 4 shows that IGHD subjects had a higher likelihood of having a prevalence of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm in the final multiple conditional regression models

Table 1. Selected matched and unmatched demographic, biological and behavioural characteristics of IGHD ($N = 32$) and Control ($N = 32$) subjects

Characteristics	IGHD ($N = 32$)	Controls ($N = 32$)
Mean age	44.8 $\pm$ 17.5	44.6 $\pm$ 17.2
Individually matched characteristics		
Age group [years; $N(\%)$]		
20–29	6 (18.8%)	6 (18.8%)
30–39	6 (18.8%)	7 (21.9%)
40–49	6 (18.8%)	6 (18.8%)
50–59	8 (25.0%)	7 (21.9%)
60+	6 (18.8%)	6 (18.8%)
Gender, males [$N(\%)$]	20 (37.5%)	20 (37.5%)
Current or former smokers [$N(\%)$]	11 (34.4%)	11 (34.4%)
Mean (SD) pack-years	4.95 (3.31)	5.30 (5.41)
Diabetes mellitus	1 (3.1%)	1 (3.1%)
Unmatched characteristics		
> 5 years of education [$N(\%)$]	15 (57.7%)	16 (53.3%)
Household size [$\geq$ four people, $N(\%)$]	16 (50.0%)	22 (68.8%)
Subjects ever treated by a dentist [$N(\%)$]	19 (59.4%)	21 (65.6%)
Subjects ever received oral health instructions [$N(\%)$]	14 (43.8%)	13 (40.6%)
Mean (SD) height (in metres)	1.23 (0.08)*	1.64 (0.10)
Mean (SD) weight (in kg)	34.7 (8.1)*	66.0 (11.7)

* $p < 0.01$.

IGHD, isolated growth hormone deficiency; SD, standard deviation.

Table 2. Selected clinical characteristics of IGHD ($N = 32$) and Control ($N = 32$) subjects

Characteristics	IGHD ($N = 32$)	Controls ($N = 32$)
Mean N teeth present (95% CI)	16.0 (13.2–18.7)	18.8 (16.8–20.7)
Prevalence PAL ≥ 5 mm (%)	100%*	71.9%
Extent PAL ≥ 5 mm [mean (95% CI)]	30.5% (20.3–40.7)*	6.7% (1.8–11.6)
Prevalence PAL ≥ 7 mm	78.1%*	12.5%
Extent PAL ≥ 7 mm [mean (95% CI)]	11.1% (5.6–16.6)*	0.6% (–0.4–1.7)
Prevalence PD ≥ 5 mm	96.9%*	21.9%
Extent PD ≥ 5 mm [mean (95% CI)]	11.4% (7.7–15.1)*	0.3% (0.1–0.5)
Prevalence PD ≥ 7 mm	46.9%*	0%
Extent PD ≥ 7 mm [mean (95% CI)]	1.5% (0.6–2.4)	–
Prevalence 30% teeth interproximal PAL ≥ 5 mm	75%*	18.8%
% sites		
$\leq 15\%$	28.1%	81.2%
Bleeding on probing		
> 15%	71.9%*	18.8%
% sites		
< 50%	40.6%	53.1%
Visible plaque		
$\geq 50\%$	59.4%	46.9%
% sites		
$\leq 25\%$	68.7%	40.6%
Supragingival calculus		
> 25%	31.3%	59.4%†

* $p < 0.01$.

† $p < 0.05$.

CI, confidence interval.

IGHD, isolated growth hormone deficiency; PAL, periodontal attachment loss.

(OR = 17.4, 95% CI = 2.3–131.2, $p = 0.004$), and a prevalence of PAL ≥ 7 mm (OR = 17.8, 95% CI = 2.3–134.9, $p = 0.005$). However, the percentage of sites with supragingival calculus had to be retained in the model because of confounding.

Discussion

To date, no study addressing periodontal parameters or destructive periodontal diseases in GHD individuals has been reported. This study provides the first data describing the PAL in the largest cohort of subjects with lifetime,

Fig. 2. The cumulative frequency distributions of periodontal attachment loss (PAL) ≥ 5 mm (a) and ≥ 7 mm (b), according to growth hormone status. IGHD, isolated growth hormone deficiency.

Table 3. Univariable logistic analyses for the 1–1 matched data, unmatched independent variables, $n = 32$ pairs

Independent variable	Levels	Prevalence PAL ≥ 7 mm				30% teeth interproximal PAL ≥ 5 mm			
		OR	95% CI	p	($n_{10};n_{01}$)*	OR	95% CI	p	($n_{10};n_{01}$)*
Education (years)	≤ 5	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	> 5	0.67	[0.11;3.99]	0.66	(11;19)	0.67	[0.11;3.99]	0.66	(11;19)
Household size	< 4	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	≥ 4	0.5	[0.13;2.0]	0.33	(13;22)	0.29	[0.06;1.38]	0.12	(15;23)
Ever treated by a dentist?	No	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	Yes	0.8	[0.21;2.98]	0.74	(11;22)	0.33	[0.07;1.65]	0.18	(12;22)
Ever received oral health instructions?	No	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	Yes	1	[0.29;3.45]	1	(17;15)	1.67	[0.40;6.97]	0.48	(18;15)
IGHD	No	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	Yes	22	[2.97;163.21]	0.003	(4;7)	19	[2.54;141.92]	0.004	(6;8)
Supragingival calculus (%)	≤ 25	Ref	—	—	—	—	—	—	—
	> 25	0.11	[0.01;0.88]	0.04	(17;17)	0.29	[0.06;1.38]	0.12	(16;15)

*Frequency of discordant pairs.

IGHD, isolated growth hormone deficiency; PAL, periodontal attachment loss; Ref, reference category.

Table 4. Final conditional multiple logistic regression analyses model for the outcome variables prevalence of PAL ≥ 7 mm and prevalence of 30% teeth with interproximal PAL ≥ 5 mm

Independent variable	Levels	Prevalence PAL ≥ 7 mm		30% teeth inter-proximal PAL ≥ 5 mm	
		OR	95% CI	OR	95% CI
IGHD	No	Ref	—	Ref	—
	Yes	17.8*	[2.3; 134.9]	17.4*	[2.3; 131.2]
Supragingival calculus (%)	$\leq 25\%$	Ref	—	Ref	—
	$> 25\%$	0.3	[0.0; 12.5]	0.5	[0.0; 12.6]

* $p < 0.01$.

IGHD, isolated growth hormone deficiency; PAL, periodontal attachment loss; Ref, reference category.

untreated, congenital IGHD described to date. Our results demonstrate that the prevalence of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm and of PAL ≥ 7 mm is higher in IGHD subjects in comparison with matched controls living in the same area.

Regarding the epidemiology of periodontal diseases in GH sufficient Brazi-

lian individuals (historic controls), only two studies, in which a full-mouth assessment of PAL in six sites per tooth was performed, are available. One was conducted in an isolated population of Cajariba, in the southeastern coastline of Brazil (Corraini et al. 2008), and another one in an urban population in southern

Brazil (Susin et al. 2004). The prevalence of PAL ≥ 5 mm was 83% and 79%, respectively, and for PAL ≥ 7 mm, it was 52% in both populations. In the present study, the prevalence of PAL ≥ 5 mm and ≥ 7 mm in the control group was 71.9% and 12.5%, respectively. The reason for the reduced prevalence we observed in our controls may be due to environmental, genetic factors or/and a small sample size. However, even on using these two Brazilian populations (Susin et al. 2004, Corraini et al. 2008) as controls, our IGHD cases presented a numerically higher prevalence and extent of PAL ≥ 5 mm and ≥ 7 mm (prevalence: 100% versus 79% (Corraini et al. 2008) and 83% (Susin et al. 2004) for PAL ≥ 5 mm, and 78.1% versus 52% (Susin et al. 2004, Corraini et al. 2008) for PAL ≥ 7 mm; extent: 30.5% versus 25% (Corraini et al. 2008) for

PAL ≥ 5 mm and 11.1% versus 11% (Corraini et al. 2008) for PAL ≥ 7 mm).

The IGHD group presented significantly less amount of supragingival calculus and more sites presenting BOP than the control group. These observations (especially BOP) could suggest that, in addition to the endocrine effects, immune function (Rapaport et al. 1995) is influenced by the severe lack of GH. This possibility is also suggested by: (1) the reduced body surface area-corrected spleen volume (an organ participating in the immune system) in these IGHD individuals (Oliveira et al. 2008), (2) the observation that GH administration enhances the function of myeloid cells and neutrophils in subjects with adult GHD (Kotzmamann et al. 1996, Derfalvi et al. 1998, Sohmiya & Kato 2001), (3) the fact that GHD increased serum pro-inflammatory cytokines (IL-6) (Leonsen et al. 2003) and (4) the GH influence on thymus' function (responsible for the generation of self-tolerant and competent naïve T-cells, as well as of self-antigen-specific natural regulatory T-cells) (Morrhaye et al. 2009).

IGHD was associated with a higher prevalence of 30% of teeth with proximal PAL ≥ 5 mm and a prevalence of PAL ≥ 7 mm in the final conditional multiple regression model (OR = 17.4 and 17.8, respectively). This stresses the possible influence of IGHD on periodontal disease. However, the reason for the large confidence interval for the OR values observed in this study may also be due to the relatively low number of subjects (Greenland et al. 2000), especially regarding the discordant pairs of the IGHD variable (Table 3). Despite this, the analysis was possible due to the strict matching procedures (Schlesselman 1982, Rothman et al. 2008), and the OR and 95% CI estimates found still provide meaningful information showing that the IGHD group presented a significantly higher prevalence of PAL compared with the control group.

One limitation of this study was that examiner blinding was obviously not possible. Because of this, measurement bias could have affected the prevalence and extent estimates of disease in the two groups (Schulz & Grimes 2002). On the other hand, the exposure (IGHD) could be assessed with a high level of precision, as it is a lifetime genetic exposure (Salvatori et al. 1999). Furthermore, the 1:1 matched strategy was used in this study because it was very difficult to achieve a higher number

of controls due to the eligibility criteria and the strict matching of cases and controls (including several matching variables). Therefore, we opted for a strict matching closest that in control group selection, as the literature shows that when study power under equal allocation is extremely small or large (<0.1 or >0.9), increasing the number of controls will not add enough to the study power (Lasky & Stolley 1994). However, this could have led to over-matching by the fact that five variables were used for matching, which can produce bias when one matches for a factor that is associated with exposure but not disease (Schlesselman 1982).

In this population, treatment with GH is offered for free to all IGHD children. But different from western societies, short stature is not considered a handicap by many families in the Itabaianina community, which is why some of the early diagnosed IGHD subjects are not treated.

Regarding the study design, it was impossible to select cases based on the outcome (due to the extremely rare pattern of this exposure); hence, cases were selected by the exposure (Wacholder et al. 1992). As stated, to avoid problems using a case-control design with a cohort method analysis, a strict matching procedure was adopted to avoid controlling for multiple potential causes of periodontal diseases in the analysis, and, in order to confirm these results, follow-up cohort studies in these exposed IGHD would be necessary.

In conclusion, untreated IGHD subjects with a homozygous *GHRHR* mutation have a greater chance of having PAL than matched local controls. The reason for this finding can only be speculated, and may be due to the effect of GHD on the periodontal tissues or/and may be mediated by the effects of the lack of GH on immune function.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs. Ivanilde Santana de Sousa for her secretarial assistance.

REFERENCES

- Aguar-Oliveira, M. H., Gill, M. S., de A Baretto, E. S., Alcântara, M. R., Miraki-Moud, F., Menezes, C. A., Souza, A. H., Martinelli, C. E., Pereira, F. A., Salvatori, R., Levine, M. A., Shalet, S. M., Camacho-Hubner, C. & Clayton, P. E. (1999) Effect of

growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**, 4118–4126.

- Aguar-Oliveira, M. H., Oliveira, F. T., Pereira, R. M. C., Oliveira, C. R. P., Blackford, A., Valença, E. H. O., Santos, E. G., Gois-Junior, M. B., Meneguz-Moreno, R. A., Araujo, V. P., Oliveira-Neto, L. A., Almeida, R. P., Santos, M. A., Farias, N. T., Silveira, D. C. R., Cabral, G. W., Calazans, F. R., Seabra, J. D., Lopes, T. F., Rodrigues, E. O., Porto, L. A., Oliveira, I. P., Melo, E. V., Martari, M. & Salvatori, R. (2010) Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the *GHRH* receptor gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95**, 714–721.
- Becks, H., Collins, D. A., Asling, C. W., Simpson, M. E., Li, C. H. & Evans, H. M. (1948) The gigantism produced in normal rats by injection of the pituitary growth hormone; skeletal changes; skull and dentition. *Growth* **12**, 55–67.
- Brixen, K., Kassem, M., Nielsen, H. K., Loft, A. G., Flyvbjerg, C. & Mosekilde, L. (1995) Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**, 1865–1874.
- Carroll, P. V. & Christ, E. R. (1998) Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 382–395.
- Clark, R. (1997) The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-I: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine Reviews* **18**, 157–179.
- Clayden, A. M., Young, W. G., Zhang, C. Z., Harbrow, D., Romaniuk, K. & Waters, M. J. (1994) Ultrastructure of cementogenesis as affected by GH in the molar periodontium of the hypophysectomized rat. *Journal of Periodontal Research* **29**, 266–275.
- Corraini, P., Baelum, V., Pannuti, C. M., Pustigliani, A. N., Romito, G. A. & Pustigliani, F. E. (2008) Risk indicators for increased probing depth in an isolated population in Brazil. *Journal of Periodontology* **79**, 1726–1734.
- Derfalvi, B., Nemet, K., Szalai, C., Keneszi, E., Sallay, P., Tulassay, T. & Falus, A. (1998) In vitro effect of human recombinant growth hormone on lymphocyte and granulocyte function of healthy and uremic children. *Immunology Letters* **63**, 41–47.
- Edwards, C. K., Lorence, R. M., Dunham, D. M., Arkins, S., Yungler, L. M., Greager, J. A., Walter, R. J., Dantzer, R. & Kelley, K. W. (1991) Hypophysectomy inhibits the synthesis of tumor necrosis factor α by rat macrophages: partial restoration by exogenous growth hormone or interferon- γ . *Endocrinology* **128**, 989–996.
- Greenland, S., Schwartzbaum, J. A. & Finkle, W. D. (2000) Problems due to small samples and sparse data in conditional logistic regression analysis. *American Journal of Epidemiology* **151**, 531–539.
- Hosmer, D. W. & Lemeshow, S. (2000) *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons.
- Juul, A., Kasrup, K. W., Pedersen, S. A. & Skakkebaek, N. E. (1997) Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**, 1195–1201.
- Kiess, W., Doerr, H., Eisl, E., Butenandt, O. & Belohradsky, B. H. (1986) Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in growth hormone deficiency. *New England Journal of Medicine* **314**, 321.

- Kotzmann, H., Riedl, M., Clodi, M., Barnas, U., Kaider, A., Höcker, P. & Luger, A. (1996) The influence of growth hormone substitution therapy on erythroid and myeloid progenitor cells and on peripheral blood cells in adult patients with growth hormone deficiency. *European Journal of Clinical Investigation* **26**, 1175–1181.
- Lasky, T. & Stolley, P. D. (1994) Selection of cases and controls. *Epidemiology Reviews* **16**, 6–17.
- Leonsson, M., Hulthe, J., Johannsson, G., Wiklund, O., Wikstrand, J., Bengtsson, B. A. & Oscarsson, J. (2003) Increased interleukin-6 levels in pituitary-deficient patients are independently related to their carotid intima-media thickness. *Clinical Endocrinology* **59**, 242–250.
- Lindsay, R., Feldkamp, M., Harris, D., Robertson, J. & Rallison, M. (1994) Utah growth study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *The Journal of Pediatrics* **125**, 29–35.
- Miettinen, O. S. (1985) The 'case-control' study: valid selection of subjects. *Journal of Chronic Diseases* **38**, 543–548.
- Morhaye, G., Kermani, H. & Legros, J. J. (2009) Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *Plos One* **4**, 5668.
- Oliveira, C. R. P., Salvatori, R. & Nobrega, L. M. A. (2008) Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Clinical Endocrinology* **69**, 153–158.
- Rapaport, R., Sills, I. N., Green, L., Barrett, P., Labus, J., Skuza, K. A., Chartoff, A., Goode, L., Stene, M. & Petersen, B. H. (1995) Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80**, 2612–2619.
- Rosen, H. N., Chen, V., Cittadini, A., Greenspan, S. L., Douglas, P. S., Moses, A. C. & Beamer, W. G. (1995) Treatment with growth hormone and IGF-I in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**, 1352–1358.
- Rothman, K. J., Greenland, S. & Lash, T. J. (2008) *Modern Epidemiology*, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Salvatori, R., Hayashida, C. Y., Aguiar-Oliveira, M. H., Phillips, J. A. III, Souza, A. H., Gondo, R. G., Toledo, S. P., Conceição, M. M., Prince, M., Maheshwari, H. G., Baumann, G. & Levine, M. A. (1999) Familial dwarfism due to a novel mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**, 917–923.
- Schlesselman, J. (1982) *Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis*. New York: Oxford University Press.
- Schulz, K. F. & Grimes, D. A. (2002) Case-control studies: research in reverse. *The Lancet* **359**, 431–434.
- Sohniya, M. & Kato, Y. (2001) Effect of long-term administration of recombinant human growth hormone (rhGH) on plasma erythropoietin (EPO) and hemoglobin levels in anemic patients with adult GH deficiency. *Clinical Endocrinology* **55**, 749–754.
- Susin, C., Vecchia, C. F. D., Oppermann, R. V., Haugejorden, O. & Albandar, J. M. (2004) Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *Journal of Periodontology* **75**, 1033–1041.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**, S5–S20.
- Tonetti, M. S. & Claffey, N., on behalf of the European Workshop in Periodontology group C. (2005) Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 210–213.
- Vimpani, G. V., Vimpani, A. F., Lidgard, G. P., Cameron, E. H. & Farquhar, J. W. (1977) Prevalence of severe growth hormone deficiency. *British Medical Journal* **2**, 427–430.
- Wacholder, S., McLaughlin, J. K., Silverman, D. T. & Mandel, J. S. (1992) Selection of controls in case-control studies. I. Principles. *American Journal of Epidemiology* **135**, 1019–1028.
- Young, W. G., Zhang, C. Z., Li, H., Lobie, P. E. & Waters, M. J. (1993) A bromodeoxyuridine immunocytochemical and morphometric study of the influence of GH on cell proliferation in odontogenic mesenchyme of the Lewis dwarf rat. *Archives of Oral Biology* **38**, 207–214.
- Young, W. G., Zhang, C. Z., Li, H., Osborne, P. & Waters, M. J. (1992) The influence of GH on cell proliferation in odontogenic epithelia by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and morphometry: a study in the Lewis dwarf rat. *Journal of Dental Research* **71**, 1807–1811.
- Zhang, C. Z., Li, H., Young, W. G., Bartold, P. M., Chen, C. & Waters, M. J. (1997) Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors* **14**, 131–143.
- Zhang, C. Z., Young, W. G., Li, H., Clayden, A. M., Garcia-Aragon, J. & Waters, M. J. (1992) Expression of growth hormone receptor by immunocytochemistry in rat molar root formation and alveolar bone remodeling. *Calcified Tissue International* **50**, 541–546.

Address:

Francisco Emilio Pustiglioni
Department of Stomatology
Division of Periodontics
University of São Paulo
School of Dentistry
Av. Professor Lineu Prestes
2227 - Cidade Universitária
São Paulo 05508-000
Brazil
E-mail: fepustig@usp.br

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: This study provides the first publication with detailed data investigating the possible association between PAL and IGHD. Besides the influence on periodontal tissues formation, GH possesses important immunoregulatory functions. This may also mediate the effect of IGHD on periodontal disease.

Principal findings: This study found that subjects with IGHD have a greater chance of having PAL.

Practical implications: IGHD may increase the risk of having periodontitis, which means that, if cohort studies can confirm this statement, population or clinical intervention by means of GH therapy can prevent periodontal breakdown in these subjects.

ANEXO B– Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR
Rua Cláudio Batista S/N – Prédio Centro de Pesquisas Biomédicas - Bairro
Sanatório
CEP: 49060-100 Aracaju -SE – Fone: (79) 2105-1805
E-mail: cephu@ufs.br

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 07/12/2011 aprovou a extensão do Projeto de Pesquisa, protocolo CEP nº 109/2008 intitulado: **“PERDA DE INSERÇÃO PERIODONTAL EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO: PREVALÊNCIA, EXTENSÃO, SEVERIDADE, INDICADORES DE RISCO”**, Nº CAAE 0073.0.107.107-08, sob a orientação do **Prof. Dr. Francisco Emilio Pustiglioni**, com alteração do título para: **“ DOENÇA PERIODONTAL EM ADULTOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO: ASPECTOS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS”**, referente ao curso de doutorado da aluna **Isabella Maria Porto de Araújo Britto**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP/UFS, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Res. CNS 196/96).

Aracaju, 14 de dezembro de 2011.

Anita Hermínia

Prof. Ms. Anita Hermínia Oliveira Souza
Coordenadora do CEP/UFS

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOU SP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Doença Periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos

Pesquisador: Isabella Maria Porto de Araujo Britto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26175513.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 500.253

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

Segundo pesquisadora: Não existe evidência na literatura a respeito da influência da Deficiência do Hormônio do Crescimento nos mecanismos imuno-inflamatórios envolvidos na destruição dos tecidos periodontais de suporte. Este estudo tem como objetivo testar a hipótese de que a deficiência isolada do hormônio do crescimento (IGHD) leve a alteração na resposta inflamatória e homeostase óssea, com conseqüente exacerbação do processo inflamatório, independente de alteração na microbiota. Será composto por amostras coletadas e armazenadas de 32 indivíduos com IGHD e 32 indivíduos controles, pareados por idade, gênero, condição sócio-econômica, fumo e diabetes. Será realizada análise dos dados clínicos periodontais longitudinais (2 anos), bem como análise de placa subgengival para verificar os níveis e proporções de microrganismos considerados patógenos periodontais, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. No fluido gengival e no sangue de ambos os grupos será analisado o perfil das citocinas inflamatórias séricas e de fluido gengival, além de mediadores de osteoclastogênese. O presente projeto refere-se às análises dos dados clínicos e das amostras microbiológica e imunológica já coletadas e aprovadas.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 500.253

Objetivo da Pesquisa:

Segundo pesquisadora: Hipótese: Com base na literatura, formulamos a hipótese de que periodontite severa detectada nos pacientes com IGHD seria resultante de reação inflamatória exacerbada em resposta à microbiota normal. Para testar esta hipótese nos propomos a analisar o perfil de citocinas séricas e de fluido gengival e a microbiota subgengival de pacientes com IGHD e controles. Estes dados serão relacionados à severidade da doença periodontal em ambos os grupos, bem como à velocidade de progressão da doença, visto que estes pacientes foram analisados clinicamente no estudo anterior (Britto et al., 2011). Se a hipótese for confirmada, é possível que o tratamento com GH promova redução do estabelecimento/progressão da periodontite, enquanto possivelmente o tratamento periodontal convencional terá menor impacto nestes pacientes com IGHD do que nos pacientes com periodontite sem a deficiência no hormônio.

Objetivo Primário: O objetivo primário deste estudo é: testar a hipótese de que a deficiência isolada do hormônio do crescimento leve a alteração na resposta inflamatória e homeostase óssea, com conseqüente exacerbação do processo inflamatório, independente de alteração na microbiota.

Objetivo Secundário: Serão analisadas amostras de pacientes com DGH e seus respectivos controles quanto a: 1- severidade e velocidade de progressão da doença periodontal 2- perfil das citocinas inflamatórias séricas e de fluido gengival e de mediadores de osteoclastogênese em fluido gengival; 3- níveis e proporções de microrganismos considerados patógenos periodontais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos diretamente envolvidos, uma vez que este estudo será realizado para analisar amostras já coletadas anteriormente com TCLEs e aprovadas por CEPs.

Benefícios: O desenvolvimento deste estudo trará benefício para a população de Itabaianinha com IGHD. O tratamento periodontal, a prevenção da progressão da doença, bem como o tratamento para reposição do GH serão realizados da forma mais eficiente e junto à equipe médica da Universidade Federal de Sergipe, em nome do Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira, que já atua nesta linha de pesquisa há 12 anos. Além disso, este será um benefício para a população como um todo, já que existem muitos indivíduos com deficiência

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 500.253

do hormônio do crescimento em níveis intermediários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão feitas análises dos dados clínicos e das amostras microbiológica e imunológica já coletadas, com TCLEs e aprovadas por CEPs (documentação anexada a este projeto).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta adequado: folha de rosto, projeto mestrado e doutorado, respectivas aprovações pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Sergipe do projeto Perda de inserção periodontal em uma população Brasileira com deficiência isolada do hormônio de crescimento: prevalência, extensão, severidade, indicadores de risco, CAAE 0073.0.107.017-08 aprovado em 5 de agosto de 2008 e ciência pelo CEP-FOUSP de 13 de agosto de 2008 aprovação, extensão e mudança de título do projeto para DOENÇA PERIODONTAL EM ADULTOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO: ASPECTOS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS, aprovado no Comitê de ética da Universidade Federal de Sergipe nº CEP 109/2008. nº CEP 109/2008 de 14 de dezembro de 2011; respectivos TCLE, e projeto atual.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora responsável foi orientada pelo membro do CEP-FOUSP para preenchimento do plataforma Brasil.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 500.253

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROJETO DE PESQUISA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa:

“Doença Periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento:
aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos”

Sr. (a)

Estamos estudando a sua gengiva e o tecido que sustenta os seus dentes. Este estudo é feito pela aluna de doutorado da Universidade de São Paulo Isabella Maria Porto de Araujo Britto, sendo orientada pelo Prof. Dr Francisco Emílio Pustiglioni e pelo Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira. Se você concordar em participar da pesquisa, os procedimentos realizados serão: coleta de dados (anotados em uma tabela) que serão obtidos através de um exame das suas gengivas com um instrumento de medida; realização de um índice de placa bacteriana/cálculo dental; coleta de placa bacteriana por meio de instrumentos não-cortantes inseridos entre a gengiva e os dentes; coleta de fluido gengival por meio da colocação de tiras de papel dentro do espaço compreendido entre a gengiva e os seus dentes; exame de glicemia (para avaliar Diabetes Mellitus, através de um furinho no dedo indicador) e exame de sangue (através da coleta de sangue no Posto de Coleta de Maria) para avaliar a resposta do corpo na presença da doença da gengiva, além de possível realização de fotografias da sua boca (sem mostrar a sua face). Dessa forma, iremos estudar a doença da sua gengiva e ver como podemos ajudá-lo. Este trabalho não traz nenhum tipo de dor e não oferece riscos à sua saúde. O (A) senhor (a) não deixará de ser atendido se não quiser participar do estudo. Se quiser participar, saiba que substituiremos o seu nome por um número e que os resultados do estudo só serão usados para buscar melhorias na sua qualidade de vida. O (A) senhor (a) ficará com uma cópia deste termo.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, R.G. _____, abaixo assinado, li todas as informações e concordo em participar da pesquisa intitulada “Doença Periodontal em adultos com Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento: aspectos clínicos, microbiológicos e imunológicos”, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira e pela pesquisadora Isabella Maria Porto de Araujo Britto sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos.

ASSINATURA DO SUJEITO DE PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

DATA: ____/____/____

ASSINATURA DO PESQUISADOR: _____

DATA: ____/____/____

Telefones para contato: (0XX79)32181805 – Prof.Dr.Manuel Hermínio Aguiar Oliveira
(0XX11) 30917833 – Msc.Isabella Maria Porto de Araujo Britto

ANEXO E – Questionário

Nome: _____ Sexo: _____
 Data do exame- ____ / ____ / ____ Data de nascimento ____ / ____ / ____
 Profissão: _____
 Quantas pessoas moram na sua casa?: _____
 Idade: ____ Estado civil: _____ Altura: ____ Peso: ____
 Endereço _____ Tel _____

Já foi ao dentista alguma vez na vida? S ____ N ____
 Com qual frequência? _____
 Se SIM: O tratamento foi urgencial? _____
 Há quanto tempo? _____
 Já recebeu orientação sobre como escovar os dentes? S ____ N ____
 Se SIM: Escova os dentes quantas vezes por dia? _____

Você fuma no momento? S ____ N ____
 Se SIM: Começou há quantos anos? _____ ano(s)
 Quantidade/dia: _____ maço(s) (20 cigarros por maço)
 O que você fuma? _____

Se NÃO:
 Você já fumou mais de 100 cigarros durante a vida? S ____ N ____
 SE SIM: Você fumou durante quantos anos? _____ ano(s)
 Quantos anos você tinha quando parou de fumar?: _____
 Quantos maços por dia? _____ maço(s)
 O que você fumava? _____

Você é diabético? S ____ N ____
 Diabetes (> 200 mg/dL): S ____ N ____
 2ª vez?: S ____ N ____
 Você toma algum medicamento? S ____ N ____
 Qual? _____

Em mulheres: Está grávida? S ____ N ____

Grau de escolaridade:
 Já estudou alguma vez? S ____ N ____
 Durante quantos anos? _____
 Você sabe ler e escrever? S ____ N ____

Renda familiar:
 Nenhuma (consome o que produz) S ____ N ____
 Valor mensal médio: _____ salários mínimos
 Sua renda muda mensalmente? S ____ N ____

ANEXO F – Ficha clínica

Nome: _____

Arco superior / face vestibular

[illegible]

Arco superior / face palatina

[illegible]

Arco inferior / face vestibular

[illegible]

Arco inferior / face lingual

[illegible]