

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

C.D. HARRY JUAN RIVERA OBALLE

EFEITOS DO ÁLCOOL E/OU TABACO NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR
ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR

Porto Alegre
2013

C.D. HARRY JUAN RIVERA OBALLE

EFEITOS DO ÁLCOOL E/OU TABACO NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR
ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica/Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano
Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Rivera Oballe, Harry Juan
Efeitos do álcool e/ou tabaco na perda óssea
alveolar espontânea em ratos wistar / Harry Juan
Rivera Oballe. -- 2013.
52 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rosing.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Álcool. 2. Tabaco. 3. Doença periodontal. 4.
Periodontite. 5. Ratos. I. Kuchenbecker Rosing,
Cassiano, orient. II. Título.

A meu pai Harry e a minha mãe Victoria, pelo amor incondicional, pelo carinho e pela solidariedade com meus projetos, anelos e metas.

À República do Perú, país maravilhoso, de milenários costumes, imponente antepassado e grandes tradições. Que representa minha vida, meu passado, meu presente e meu futuro.

AGRADECIMENTOS

Dedico esta dissertação, a Deus por dar-me a oportunidade de estar neste maravilhoso país chamado Brasil e nesta Universidade de excelência internacional.

A meus pais, pelo amor e pelo apoio incondicional em minha vida, profissional e acadêmica.

A meus queridos e amados irmãos Giovanna e Gustavo por estarem sempre me apoiando e me alentando nesta nova experiência acadêmica e profissional.

Ao Governo Brasileiro pelo convênio PEC-PG através de sua entidade financiadora CNPq que iniciou o sonho de poder estudar aqui permitindo concluir meu mestrado.

Dedico esta dissertação também a meu orientador, amigo e colega Professor Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing pelo apoio constante, amizade incondicional, pelas palavras e pela confiança depositada em mim.

À Professora Dra. Rosane Gomez, pela parceria e gentileza para a execução e realização desta dissertação.

A UFRGS, que proporcionou toda a infraestrutura, a logística e facilidades na realização de meu mestrado.

A meu professor, amigo e colega Dr. Eduardo José Gaio pela paciência, amizade, apoio e oportunidade que me deu para trabalhar com ele, compartilhando sua experiência acadêmica e científica.

Aos meus Professores da Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS por seu ensino, amizade, por seus conselhos, por suas experiências: Rui Oppermann, Alex Haas, Fernando Daudt, Marilene Fernandes, Patricia Weidlich Sabrina Gomes, Juliano Cavagni e Tiago Fiorini,.

A meus irmãos brasileiros Tobias Spuldaro e Marcelo Ribas pelo apoio incondicional, conselhos e motivação nos momentos mais importantes de minha vida em Porto Alegre.

A Adriana Soares pela alegria, amizade e colaboração.

A meus colegas de doutorado Patrícia Angst, Amanda Stadler, José Mariano da Rocha, Marcius Wagner, Marta Musskopf, Paulo Colussi, Ingrid Sanada, Bruna Greggianin, Marlon Montenegro e Cassio Kampits, pela hospitalidade, amizade e parceria.

Aos amigos e colegas do mestrando em Periodontia: Marina Mendez, Marcelo Ribas, Tobias Spuldaro, Juliane Butze, Viviane Barbosa, Luciana Daudt, Ricardo Costa, Fernando Rios e João Peixoto. Pela amizade, companheirismo e parceria.

Aos alunos de iniciação científica da periodontia Vagner Soster, Andressa Moreira, Bárbara Christofoli, Natalia Silva, Michelle Antonette, Mauricio Anastásio, Bruna De Lara Roesch, Luiza Gasparotto, André Dos Santos e Renata Rufino

La vida es una oportunidad, benefíciate de ella.
La vida es belleza, admírala. La vida es un
sueño, alcánzalo. La vida es un desafío,
enfrentalo, La vida es un juego, juégalo.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

RIVERA OBALLE, Harry. **Efeitos do álcool e/ou tabaco na perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar**. 2013. 52f. Dissertação da finalização do Mestrado em Clínica Odontológica / Periodontia (Pós-Graduação). Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do álcool e /ou tabaco na perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar. Para isto, foram utilizados 24 animais machos, com aproximadamente 290 g de peso. Estes, foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle (G1, N = 6), recebeu uma solução glicosada (5%) duas vezes por dia; grupo álcool (G2, N = 6) recebeu 2 g/kg de álcool (20%) duas vezes por dia; grupo tabaco (G3, N = 6) recebeu 6 cigarros duas vezes por dia; grupo álcool + tabaco (G4, N = 6) recebeu 2g/kg de álcool (20%) mais 6 cigarros, duas vezes por dia. O tempo experimental foi de 4 semanas. Todos os animais receberam alimento e água *ad libitum*. Para a análise morfométrica, as maxilas foram removidas e preparadas para fotografias padronizadas. Os resultados mostram que o consumo de ração ao longo do experimento diminuiu significativamente, exceto para o G3. Entretanto, todos os grupos experimentais aumentaram o peso significativamente durante o estudo. A média de perda óssea (\pm DP) alveolar foi de 0.31 mm (\pm 0.08), 0.29 mm (\pm 0.07), 0.33 mm (\pm 0.10), e 0.33 mm (\pm 0.08) para G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos. No entanto, quando avaliada a ocorrência de doença periodontal por meio de ponto de corte (percentil-75), pode-se observar que houve uma diminuição na ocorrência de perda óssea alveolar espontânea no grupo álcool e um aumento na ocorrência no grupo tabaco. A combinação de álcool+tabaco não diferiu estatisticamente do grupo controle.

PALAVRAS CHAVE: Álcool; Tabaco; Doença periodontal; Periodontite; Ratos

ABSTRACT

RIVERA OBALLE, Harry. **Effects of alcohol and/or tobacco on spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.** 2013. 52f. Dissertation of the completion of a Master's Degree in Dental Clinics/Periodontology (Post Graduate). School of dentistry. Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013

The aim of the present study was to evaluate the effect of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. Twenty four, male, 60 days-old, Wistar rats were assigned to four groups: Group 1 received 10 mL/kg of glucose solution (5%). Group 2 received 2 g/kg alcohol (20%). Group 3 was exposed to tobacco smoke (6 cigarettes/60 min). Group 4 received both interventions of groups 2 and 3. Alcohol was given by gastric gavage and cigarette exposure was performed using a forced ventilation chamber. After 30 days, animals were sacrificed and the upper maxillae removed and defleshed. Morphometric analysis of alveolar bone loss (ABL) around the second molar was performed in standardized digital photographs. Analysis was conducted using paired t-test, one-way ANOVA and occurrence of spontaneous periodontal disease (ABL \geq 0.39 mm) was analyzed by Fisher's exact test. Significant differences in body weight were observed between all groups. Group 2 presented higher body weight as compared to the 3 other groups at 4 weeks ($P \leq 0.05$). Mean ABL (\pm SD) values were 0.31 mm (\pm 0.08), 0.29 mm (\pm 0.07), 0.33 mm (\pm 0.10), and 0.33 mm (\pm 0.08) for groups 1, 2, 3, and 4, respectively. No significant differences were found among groups. In the analysis of occurrence of periodontal breakdown, alcohol exposure decreased the occurrence of ABL and cigarette exposure increased ABL. The combination of alcohol and cigarette exposure did not differ from the control group. Light to moderate alcohol consumption decreased the occurrence of periodontal breakdown, while tobacco increased this rate.

KEYWORDS: Alcohol; Tobacco; Periodontal disease; Periodontitis; Rats

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DO TABACO	15
2.2	EFEITOS DO TABACO SOBRE O PERIODONTO	16
2.3	EFEITOS DO TABACO SOBRE A MICROFLORA BACTERIANA	17
2.4	EFEITOS DO TABACO SOBRE O FLUXO SANGUÍNEO	17
2.5	EFEITOS DO TABACO SOBRE A RESPOSTA CELULAR E INFLAMATÓRIA	17
2.6	EFEITOS DO TABACO SOBRE A CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL	18
2.7	EPIDEMIOLOGIA PERIODONTAL ASSOCIADA AO TABACO	18
2.8	EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DO ÁLCOOL	20
2.9	EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE O ORGANISMO	21
2.10	EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE O PERIODONTO	22
3	OBJETIVO	
4	METODOLOGIA	23
4.1	AMOSTRA	23
4.2	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES	24
4.4	CÂMARA DE VENTILAÇÃO FORÇADA	24
4.5	SACRIFÍCIO E PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS	25
4.6	CEGAMENTO DAS MENSURAÇÕES E CONFIABILIDADE DOS DADOS	27
4.7	DEFINIÇÃO DE OCORRÊNCIA DE DESTRUIÇÃO PERIODONTAL ESPONTÂNEA	27

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 ARTIGO CIENTIFICO	29
<i>Effects of the alcohol and/or tobacco on spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.</i>	
ABSTRACT	30
1 INTRODUCTION	31
2 MATERIALS AND METHODS	32
2.1 Study design	32
2.2 Animals and experimental procedures	32
2.3 Glucose and alcohol solution	33
2.4 Forced ventilation chamber	33
2.5. Morphometric analysis	33
2.6 Definition of spontaneous periodontal breakdown	34
2.7 Statistical analysis and reproducibility	34
3 RESULTS	34
4 DISCUSSION	35
5 REFERENCES	39
6 FIGURE LEGENDS	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Em muitas partes do mundo o consumo de álcool e a exposição ao tabaco são considerados como drogas lícitas e são amplamente consumidas na população (JERNIGAN et al., 2000). Diversos estudos têm apontado para as possíveis conseqüências à saúde dos indivíduos, tais como os problemas cardiovasculares (isquemia cerebral, infarto agudo do miocárdio e hipertensão (AMARAL et al., 2009; MALHOTRA et al., 2010) e a certos tipos de câncer (boca, pulmão, esôfago), (THAKKER, 1998; REIDY et al., 2011; WENDER et al., 2013) além de outras doenças crônicas. Diante do excessivo consumo dessas substâncias psicoativas e dos seus problemas gerados à saúde bem como os elevados custos que lhe são atribuídos, as autoridades têm reconhecido o consumo de álcool e tabaco como importantes problemas de saúde pública (VARONA et al., 2011).

Os mecanismos biológicos que atuam sobre células, tecidos e órgãos ainda não são completamente entendidos pela sociedade científica. No entanto, sabe-se, que a atuação dessas substâncias interfere na resposta imune-inflamatória, predispondo os indivíduos a uma série de danos. Atualmente, o papel do fumo sobre os componentes imune-celulares, bem como seus desfechos sobre o organismo é melhor compreendido do que o papel do álcool. Sabe-se, por exemplo, que a exposição ao tabaco, na maioria das doenças crônicas, apresenta um claro efeito dose-resposta (JONHSON et al., 2004). Entretanto, evidências epidemiológicas recentes, ao que se refere ao consumo de álcool nas formas leve a moderada, têm apontado para um risco em curva tipo “U” ou “J”. Ou seja, consumidores leves a moderados de álcool têm apresentado um efeito protetor a uma série de doenças crônicas quando comparados a pacientes abstêmios ou consumidores severos (GONZÁLEZ-GROSS et al., 2000; DIAZ et al., 2002). É notório também, de acordo com diferentes estudos, que o consumo agudo de álcool configura em aumento de risco à saúde dos indivíduos (LAGES et al., 2012).

Diante dos possíveis efeitos deletérios ou não do tabaco e do álcool sobre a resposta imune-inflamatória, o estudo dessas duas substâncias se justifica e

é impreterível no aprofundamento do conhecimento sobre a etiopatogênese das doenças periodontais destrutivas, em especial à periodontite. Essa é uma doença de natureza bacteriana com um importante componente inflamatório envolvido, que se não tratada pode levar a perda de dentes devido à ampla destruição óssea. De maneira semelhante ao que acontece com as doenças crônicas como as cardiopatias, o conhecimento dos efeitos do tabaco sobre os tecidos periodontais está bem descrito na literatura, constituindo ao fumo o reconhecimento de principal fator de risco às periodontites. Por outro lado, recentes estudos epidemiológicos (JANSSON, 2008) e em animais (IRIE et al., 2008; LIBERMAN et al., 2010; DANTAS et al., 2012) têm demonstrado efeitos díspares da relação entre o consumo de álcool e o periodonto. Nesse sentido, a proposta da presente Dissertação foi de investigar, em modelo animal, as possíveis influências dessas importantes substâncias psicoativas e amplamente consumidas sobre a perda óssea alveolar espontânea.

1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do consumo do tabaco

Apesar do conhecimento secular sobre os problemas associados ao consumo de tabaco e do progresso e conscientização no desenvolvimento de políticas públicas, o consumo do tabaco comporta-se como uma epidemia e está em expansão. Além do crescimento do número total de fumantes, o número de mortes relacionadas ao tabaco continua aumentando, de tal forma que se projeta um importante incremento no número de mortes para 2030 (WARREN et al., 2009; MACKAY, 2012). Essa tendência, em grande parte, se deve ao aumento da população mundial e ao envelhecimento nos países de baixa e média renda.

Atualmente, a maioria de fumantes é constituída por homens, residentes em países com baixa e média renda. Quase um terço destes, aproximadamente 300 milhões, vive na China. A epidemia do tabaco começou mais tarde nas mulheres. Contrariamente ao que se observa para os homens, a prevalência

de tabagismo entre as mulheres é baixa na maioria dos países com baixa e média renda. Entretanto, essa prevalência aumentou drasticamente nos países de alta renda nos últimos anos. Hoje, cerca de 250 milhões de mulheres fumam ao redor do mundo (MACKAY, 2012).

De acordo com o relatório de 2011 da Organização Mundial da Saúde, o uso do tabaco continua sendo a principal causa mundial de morte evitável. O seu consumo mata cerca de 6 milhões de pessoas e é responsável por centenas de bilhões de dólares em prejuízos econômicos em todo o mundo a cada ano. A maioria dessas mortes ocorre nos países com baixa e média renda, e essa disparidade deverá aumentar ainda mais ao longo das próximas décadas. Se as tendências atuais continuarem, em 2030 o tabaco matará mais de 8 milhões de pessoas no mundo a cada ano, sendo que 80% destas mortes ocorrerão nos países com baixa e média renda (WHO, 2011).

2.2 Efeitos do tabaco sobre o periodonto

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa que contém mais do que 4.000 substâncias tóxicas, dentre elas o monóxido de carbono, os radicais oxidativos, a nitrosamina (carcinógeno) e a nicotina (BENOWITZ, 1996). Além dos efeitos negativos já conhecidos do tabaco sobre organismo, que acarretam em aumento da suscetibilidade a doenças cardiovasculares, o tabaco também é considerado como o principal fator de risco para as doenças periodontais (GENCO, BORGNACKE, 2013). Entretanto, os reais mecanismos pelos quais o tabagismo participa da cadeia causal da periodontite ainda não são completamente compreendidos. De qualquer maneira, entende-se que esses efeitos adversos possuem ações em diferentes momentos da etiopatogênese da doença periodontal, dentre eles no início (desenvolvimento), na progressão e na cicatrização periodontal. Portanto, é lícito supor que a exposição ao tabaco promove alterações importantes na microbiota bacteriana, no fluxo sanguíneo gengival, na defesa inata (neutrófilos) e específica (linfócitos T), na produção de citocinas pró-inflamatórias e na cicatrização periodontal.

2.3 Efeitos do tabaco na microflora bacteriana

Pesquisas têm encontrado em tabagistas maiores índices de periodontopatógenos específicos, incluindo a *Porphyromonas gingivalis*, o *Treponema denticola* e a *Tannerella forsythia*. Estes achados têm constituído a base para o entendimento da elevação do risco ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal (KAZOR, 1999; ZAMBON, 1996). Esses resultados não são observados como uma constante, sendo que alguns estudos não têm conseguido demonstrar diferenças marcantes na microbiota (GOMES et al., 2008). Uma das possibilidades de explicação para as eventuais diferenças observadas na microbiota de indivíduos expostos ao tabaco está que o desenvolvimento da doença propiciado pela resposta ineficiente do hospedeiro, gerando aumento de profundidade de sondagem, por exemplo, seja responsável pela presença dos periodontopatógenos específicos.

2.4 Efeitos do tabaco no fluxo sanguíneo

Outra linha de evidência sugere que a exposição contínua ao tabaco leva a efeitos sobre vasoconstrição periférica e a diminuição do número de vasos sanguíneos circulantes (BERGSTROM, BOSTROM, 2001; MOROZUMI, 2004). Esses eventos vasculares, por sua vez, podem levar a uma diminuição do aporte sanguíneo gengival. Como consequência clínica direta, pacientes fumantes normalmente apresentam menor sangramento gengival quando comparados a indivíduos que não fumam. Além disso, esse comprometimento microvascular pode reduzir a tensão de oxigênio no interior da bolsa periodontal, favorecendo assim o crescimento e proliferação de bactérias anaeróbias no sítio subgengival. Por outro lado, estudos clínicos têm contestado essas hipóteses, mostrando que há aumento do fluxo sanguíneo gengival imediatamente após o ato de fumar (BAAB, OBERG, 1987; MEEKIN, 2000).

2.5 Efeitos do tabaco na resposta celular e inflamatória

De forma consistente, evidências têm ligado a exposição ao tabagismo, em especial à nicotina, a alteração de função de importantes células de resposta inflamatória, como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T

(PALMER et al., 2005). Os polimorfonucleares neutrófilos constituem parte fundamental da resposta inata do organismo, sendo reconhecidos como a primeira linha de defesa. Junto com a ação de defesa dos macrófagos contra a invasão bacteriana, os neutrófilos são capazes de desequilibrar a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) α , Interleucina (IL) -1 e IL-6. Esse desequilíbrio dos mediadores químicos inflamatórios pode representar ao indivíduo uma infamação sistêmica e crônica de baixa intensidade, com possíveis danos a diversos órgãos (OFFENBACHER, BECK, 2001; D'AIUTO et al., 2004).

Além da modulação da resposta inata, o fumo é capaz de alterar a resposta específica do periodonto. Estudos têm demonstrado que fumar eleva o número de linfócitos T do tipo CD3, CD4 e CD8 nos tecidos periodontais, alterações essas associadas há uma maior destruição periodontal (LOOS, 2004).

2.6 Efeitos do tabaco na cicatrização periodontal

Os componentes do cigarro são capazes de inibir a proliferação, a quimiotaxia e a fixação dos fibroblastos do periodonto (CUFF, 1989; JAMES, 1999). Sendo assim, os indivíduos expostos ao tabaco apresentam, de forma substancial, piores prognósticos de cicatrização periodontal após terapia, seja cirúrgica ou não.

Embora existam vários possíveis mecanismos que podem explicar os maiores níveis de doença periodontal e redução da cicatrização observados em indivíduos expostos ao tabaco, não há nenhuma evidência clara que aponte para um mecanismo particular, como sendo de maior importância.

2.7 Epidemiologia periodontal associada ao tabaco

A relação existente entre tabaco e doença periodontal foi primeiramente descrita por Pindborg (1947). Naquele momento, o autor descreveu uma maior prevalência de gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA), uma descoberta que foi confirmada em muitos outros estudos subsequentes desta condição (KOWOLIK, NISBET, 1983; JOHNSON, ENGEL, 1986). Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas epidemiológicas de base populacional e ensaios clínicos têm mostrado consistentemente piores condições

periodontais nos indivíduos expostos à fumaça do cigarro (BERGSTROM et al., 2000; WANG et al., 2009; JAVED et al., 2012).

Os primeiros estudos associativos, realizados na década de 70 e 80, mostravam claramente que indivíduos fumantes apresentavam níveis de doença periodontal destrutiva mais avançados quando comparados a indivíduos não-fumantes. De maneira semelhante, esses estudos também encontravam nos pacientes fumantes os piores níveis de higiene bucal (BRANDZAEG, JAMISON, 1984) e os maiores índices de cálculo (ALEXANDER, 1970; SHEIHAM, 1971). Devido a esse paradigma, acreditava-se na época que o fumo não era um fator de risco independente para a periodontite e sim, que o mau controle de biofilme por si só explicaria as diferenças nos níveis de doença periodontal entre fumantes e não-fumantes. Com o passar do tempo, o emprego de análises estatísticas mais sofisticadas demonstrou que indivíduos fumantes apresentam maior severidade e extensão de doença periodontal independentemente da higiene bucal (ISMAIL et al., 1983; BERGSTROM, PREBER, 1994). Por exemplo, no estudo de Erie County (GROSSI, 2004; GROSSI, 2005) os autores mostram que mesmo após os ajustes para fatores de confusão, o fumo foi um dos principais fatores de risco à doença periodontal destrutiva, com *Odds Ratio* variando entre 4 e 5. De maneira semelhante, Susin et al. (2004) também demonstraram um efeito deletério da exposição ao cigarro sobre o periodonto em uma amostra representativa da região metropolitana de Porto Alegre.

Atualmente, a importância do tabagismo como fator de risco para a doença periodontal é suportada por diferentes critérios. Entre eles, estão a consistência dos resultados entre vários estudos, a força da associação, o efeito dose-resposta, relação temporal entre a exposição ao fumo e o desenvolvimento da doença, e a plausibilidade biológica. Por exemplo, Papapanou (1996) mostrou uma forte consistência a partir de uma meta-análise com seis estudos (2.361 indivíduos). Para todos os seis estudos incluídos, *Odds Ratio* estimado foi de 2,82 (IC 95%: 2,36-3,39). Além disso, diversos estudos mostram um efeito dose-resposta (GROSSI et al., 1994; SUSIN et al., 2004). Grossi et al. (1994) mostram que, conforme aumenta o número consumido de maços/ano, a quantidade de perda de inserção

também é maior. Os resultados sobre a associação do tabagismo com a perda dentária também são consistentes, mesmo entre diversas populações, como na Austrália (ARORA et al., 2010), Brasil (HAAS et al., 2012), Índia (BHAGYAJYOTHI et al., 2011), Tailândia (TORRUNGRUANG et al., 2012), Estados Unidos (ALBANDAR et al., 2000; KRALL et al., 2006) e na Europa. Infelizmente, existem poucos estudos epidemiológicos longitudinais avaliando o fumo sobre a doença periodontal. De acordo com Thomson et al, (2004), após um acompanhamento de 5 anos, fumar não representa um fator de risco significativo para a incidência de perda de inserção periodontal entre sul-australianos com mais 60 anos. No entanto, existem inúmeros estudos clínicos que mostram o efeito negativo do fumo na resposta ao tratamento periodontal (BERGSTRÖM et al., 2000; BERGSTRÖM et al., 2003; PEARSON et al., 2003; WAN et al., 2009), bem como os benefícios ao periodonto na cessação do fumo (PRESHAW et al., 2005, THOMSON et al., 2007, ROSA et al., 2011; FIORINI et al., 2013).

2.8 Epidemiologia do consumo de álcool

Em muitas partes do mundo, o consumo de bebidas alcoólicas é uma característica comum em encontros sociais, desempenhando um papel tradicional e social. No entanto, o consumo exagerado e contínuo de álcool aumenta o risco de dependência e de danos relacionados à saúde do indivíduo, tais como: distúrbios psicomotores, hepatites e câncer. A associação entre a exposição do álcool e o risco de desenvolver doenças é multifatorial, variando consideravelmente entre os fatores genéticos e sócio-econômicos-culturais. Entre os principais, está o gênero e a idade (THAKKER, 1998). Estudos epidemiológicos recentes revelam dados preocupantes quanto ao início à exposição ao álcool em adolescentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% dos homens e 60% das mulheres adolescentes consumiram álcool em algum momento de sua vida (WHO, 2011). Ainda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), é atribuído anualmente ao consumo excessivo de álcool aproximadamente 2,5 milhões de mortes.

De uma maneira geral, tanto o tipo quanto a quantidade de álcool consumido tem mudado nos últimos anos. De acordo com o relatório

mundial sobre consumo de álcool (WHO, 2011), a exposição registrada de álcool está diminuindo nos países desenvolvidos e aumentando nos países em desenvolvimento. Entretanto, o consumo *per capita* na maioria dos países em desenvolvimento é consideravelmente menor do que nos países industrializados.

Nos últimos anos, uma atenção especial tem se dado para os indivíduos expostos ao consumo leve/moderado de álcool. Esse foco se explica devido ao fato de que o risco atribuído a diversas doenças sistêmicas induzidas pelo álcool formar uma curva em formato de “J” ou “U” (GONZÁLEZ-GROSS et al., 2000; DIAZ et al., 2002). Isso significa que indivíduos expostos ao álcool em proporções leve/moderadas apresentam melhores condições de saúde do que indivíduos que consomem álcool em proporções graves.

2.9 Efeitos do álcool sobre o organismo

Os estudos sobre os possíveis efeitos biológicos do álcool sobre os tecidos periodontais são bastante escassos na literatura e, portanto, os reais mecanismos que explicam os possíveis eventos, sejam protetores ou não ao periodonto, permanecem ainda obscuros. A maior parte das evidências advém de estudos da área médica, portanto, são evidências indiretas. Por exemplo, Szabo (1999) reportou como consequência do consumo de álcool o desenvolvimento de deficiências na ação do neutrófilo, enquanto que Trevisiol et al. (2007) relataram a possível ocorrência de danos no metabolismo ósseo. Já Offenbacher (1996) cita que o consumo elevado de álcool é capaz de estimular a produção de TNF- α e IL-6 por parte dos monócitos no sulco gengival. Além disso, Irie et al. (2008) sugeriram que o consumo crônico de álcool aumenta a quantidade de espécies reativas de oxigênio na gengiva. Portanto, é licito supor que o desequilíbrio desses eventos biológicos possa levar ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal destrutiva.

Por outro lado, estudos recentes que melhor controlam importantes variáveis como gênero, idade, nível sócio-econômico, tipo e quantidade de álcool têm apontado para efeitos benéficos do consumo leve-moderado de álcool sobre o sistema imune-inflamatório. Em um estudo multicêntrico,

Imhof et al. (2004) reportaram que o consumo moderado de álcool foi capaz de reduzir a produção e circulação de monócitos produtores de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, além de estar associado a baixos níveis de proteína C-reativa. Além disso, estudos demonstram claramente o aumento do número de células responsáveis pela defesa imune específica, como os linfócitos T (CD3, CD4, CD8), quando o consumo se dá de forma leve-moderada (MENDENHALL et al., 1997; ROMEO et al., 2007). Por outro lado, o consumo crônico e severo é capaz de diminuir essas importantes células de defesa (BOYADJIEVA et al., 2002). Além do efeito anti-inflamatório associado a pequenas quantidades de ingestão de álcool e dos benefícios no sistema imunológico do hospedeiro, é possível que exista um eventual efeito antimicrobiano sobre o biofilme dental.

2.10 Efeitos do álcool sobre o periodonto

Estudos em animais avaliando o consumo de álcool e a destruição periodontal têm apresentado resultados díspares. Enquanto Irie et al. (2008) demonstraram uma maior destruição periodontal espontânea em dentes de ratos submetidos a álcool 20%, Liberman et al. (2011) evidenciaram um efeito protetor do consumo de álcool a 5% sobre a perda óssea alveolar espontânea. É importante ressaltar que em nenhum dos estudos supracitados os autores observaram maior destruição periodontal associada ao consumo de álcool em dentes com doença periodontal induzida por ligadura. Ressalte-se também que as concentrações utilizadas nos dois estudos são bastante diferentes. Por outro lado, Souza et al. (2009) e Dantas et al. (2012) demonstraram, após indução de periodontite por meio de ligadura, maior destruição de osso alveolar em ratos submetidos ao consumo de álcool.

Estudos em humanos também têm demonstrado resultados controversos no que tange o consumo de álcool e a destruição periodontal. Diferentes tipos de estudos têm sugerido efeitos deletérios ao periodonto, enquanto que outros têm reportado ausência de danos ou até mesmo uma proteção. A maioria dos estudos epidemiológicos transversais associa o consumo de álcool a piores parâmetros clínicos periodontais, como a profundidades de

sondagem (ALBANDAR, 2002; AMARAL et al., 2008), a perda de inserção clínica (TEZAL et al., 2004) e o aumento do sangramento à sondagem (TEZAL et al., 2001). Atualmente, dois estudos epidemiológicos longitudinais não demonstraram qualquer associação com o aumento da ocorrência de doença periodontal (OKAMOTO et al., 2006; JANSSON, 2008), um estudo observa uma relação protetora (KONGSTAD et al., 2008) e outro um efeito deletério do álcool sobre a doença periodontal auto-reportada (PITIPHAT et al., 2003).

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito do álcool e/ou tabaco na perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar

4 METODOLOGIA

A presente pesquisa faz parte de um estudo maior coordenado pela professora Rosane Gomez, alocada no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cujo título é “Efeito da associação do álcool e cigarro sobre a proliferação celular hipocampal e memória em ratos”. O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), encontrando-se registrado sob o número de protocolo 19566. Este está de acordo com as normas de pesquisas estipuladas pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Além disso, se encontra em conformidade com os regulamentos estabelecidos pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e as Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais. Todos os procedimentos necessários para minimizar a dor e desconforto foram realizados pelos investigadores.

4.1 Amostra

Foram utilizados, no presente estudo, 24 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 290 gramas. Os animais foram mantidos em caixas-moradia

em grupo de 6, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, em sala com temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com livre acesso a comida e água. O consumo destes alimentos foi controlado semanalmente.

4.2 Distribuição dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e o período experimental durou 4 semanas.

Grupo 1 (Controle; N = 6): os animais foram expostos a 10mL/kg de solução glicosada (5%) por meio de gavagem gástrica, duas vezes ao dia.

Grupo 2 (Grupo Álcool; N = 6): os animais foram expostos a 2 g/kg de solução de álcool (20%) por meio de gavagem gástrica, duas vezes ao dia.

Grupo 3 (Grupo Tabaco; N = 6): os animais foram expostos a fumaça de 6 cigarros (Marlboro® Light, Philip Morris Brasil, São Paulo, Brasil) por inalação durante 60 minutos e 10mL/kg de solução glicosada (5%) por meio de gavagem gástrica, duas vezes ao dia.

Grupo 4 (Grupo Álcool +Tabaco; N = 6): os animais receberam a mesma intervenção dos Grupos 2 e 3, duas vezes ao dia, sendo que a solução de álcool foi administrada antes da exposição à fumaça do cigarro. Cabe lembrar que neste grupo experimental não foi administrada a solução glicosada (5%), a fim de não expor os animais a dupla gavagem gástrica.

4.3 Preparo das soluções

A solução glicosada a 5% foi preparada a partir da diluição de 5 gramas de glicose em 100 mL de água destilada. A solução de álcool foi obtida a partir da diluição de álcool (99% Merck, SP) nesta solução glicosada (5% Merck, SP), a fim de obter uma solução de álcool a 20% (peso/volume). Estudos têm demonstrado que essa concentração de glicose é capaz de aumentar a absorção do álcool com sucesso.

4.4 Câmara de ventilação forçada

Para fins de exposição à fumaça dos cigarros nos Grupos 3 e 4, foram desenvolvidas câmaras de vidro transparente, com dimensões de 50x50x30 cm. Estas eram hermeticamente fechadas com exceção a dois orifícios que permitiam a entrada e saída de ar num fluxo de 10L/min (PEREIRA et al., 2012). Ao orifício de entrada foi acoplado um pequeno dispositivo que permitia a conexão e queima do cigarro. No outro orifício, foi conectada uma bomba de sucção de ar, permitindo assim o fluxo constante no interior da câmara. A queima de 1 cigarro durava aproximadamente 10 minutos. A fim de que não houvesse a intoxicação pela inalação da fumaça, era provido aos animais outros 10 minutos sem a queima do cigarro. Sendo assim, como eram fornecidos 6 cigarros por turno experimental, todo o procedimento de inalação durava cerca de 2 horas. A fim de induzir estresse semelhante, cabe lembrar que os Grupos experimentais 1 e 2 permaneceram em câmaras idênticas, durante o mesmo tempo que os Grupos 3 e 4, muito embora sem a exposição à fumaça do cigarro. Assim, esses grupos experienciavam a troca de ambiente, os ruídos e todas as outras características da manipulação, à exceção da fumaça. Diariamente, os procedimentos experimentais (gavagem + inalação) iniciavam às 09:00 e às 14:00 para todos os grupos experimentais e tinham duração aproximada de 150 minutos.

De acordo com o fabricante do cigarro, este contém 0,8 mg de nicotina por unidade. A concentração de monóxido de carbono dentro das câmaras foi monitorada com aparelho manual (Bacharach Monoxor II®, Pensilvânia, EUA) a fim de manter as mesmas condições para todos os animais.

4.5 Sacrifício e preparo das peças anatômicas

Os animais foram postos em jejum e retirados todos os procedimentos 12 horas antes do sacrifício por decapitação. As maxilas foram removidas, divididas em lado direito e esquerdo. Após isso, as maxilas foram colocadas em potes de plástico, devidamente identificadas, com solução de formalina tamponada a 10%.

Para fins de mensuração morfométrica, a matéria orgânica das peças foi removida cuidadosamente com o auxílio de hipoclorito de sódio a 9%

(Mazzarollo®, Gravataí, Brasil) durante um período aproximado de 4 horas. Posteriormente, as peças foram lavadas e secas para sua manipulação e preparação. Para melhor definição da junção amelo-cementária (JAC), as peças foram coradas com azul de metileno a 1% (Quinta Essência, Porto Alegre, Brasil), com ajuda de microbrush.

Para posterior morfometria e padronização das fotografias, as peças foram acopladas em régua milimetrada endodôntica com o auxílio de cera 7, de modo que a oclusal permanecia paralela ao solo (Figura 1). Cabe lembrar que a régua era suspensa por duas bases de silicone pesada previamente desenvolvidas para este tipo de estudo. As fotografias padronizadas foram realizadas com câmera D50 (Nikon®, Ayuttaya, Tailândia), apoiada em tripé, com aproximação focal máxima. As peças foram fotografadas por vestibular e palatino, nos lados direito e esquerdo (Figura 2). Para avaliação da perda óssea alveolar, medidas lineares perpendiculares à régua foram realizadas entre a JAC e a crista óssea em cinco pontos distintos (duas na raiz distal, duas na raiz mesial, uma na região de furca) de cada face, por meio de programa de imagem Adobe Photoshop® CS4 (Adobe Systems Inc., Califórnia, EUA). Individualmente, todas as medidas lineares foram realizadas em pixels e convertidas em milímetros, conforme as marcações presentes na régua endodôntica. A média das 5 medidas representavam a perda óssea alveolar da face.



Figura 1. Peça anatômica sendo fotografada de forma padronizada com ajuda de bases de silicone, régua milimetrada e cera 7.

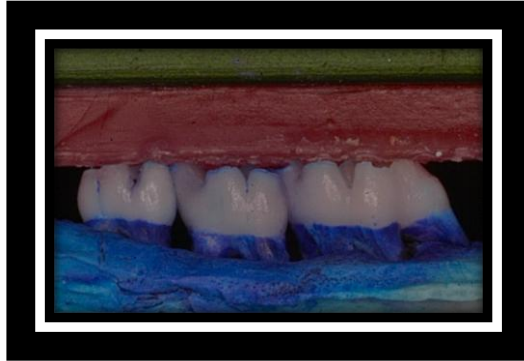


Figura 2. Fotografia da maxila, por palatino, com JAC evidenciada por azul de metileno a 1%.

4.6 Cegamento das mensurações e confiabilidade dos dados

Após a realização de todas as fotografias (JC, HR), estas foram renomeadas de forma que o examinador não soubesse a qual grupo experimental a fotografia pertencia. Portanto, um examinador cego aos grupos experimentais (EJG) procedeu à leitura e mensuração de todas as fotografias, registrando em planilha Excel® (Microsoft®, Califórnia, EUA) as medidas. Posteriormente, as medidas foram decodificadas e reagrupas conforme seu grupo experimental pelos pesquisadores (JC, HR). Para fins de reprodutibilidade, 12 fotografias foram escolhidas randomicamente e reavaliadas em um intervalo de uma semana pelo mesmo examinador. O coeficiente de correlação intra-classe (ICC) entre as medidas foi de 0,93.

4.7 Definição de ocorrência de destruição periodontal espontânea

O desfecho primário do presente estudo foi à ocorrência de destruição periodontal espontânea. Para isso, um ponto de corte foi estabelecido, a fim de definir a ocorrência de destruição periodontal a partir da análise dos dados do grupo controle (Grupo 1). Portanto, para representar a presença de doença espontânea, o percentil-75 do grupo controle foi escolhido. Assim, as faces com média de perda óssea alveolar $\geq 0,39$ milímetros

foram consideradas como doentes, ou seja, com destruição periodontal espontânea.

4.8 Análise estatística

Para avaliação da normalidade de todas as variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. A diferença no peso corporal médio no início e fim do estudo, em cada grupo experimental, foi avaliada por meio de teste t pareado (análise intragrupo) e ANOVA (análise entre grupos). Média e desvio-padrão da distância da JAC à crista óssea alveolar, além do consumo de alimentos para os diferentes grupos experimentais foram calculados e comparados por ANOVA. Sítios classificados como positivos e negativos para a ocorrência da doença periodontal foram comparados pelo teste exato de Fisher e interpretados pela análise dos resíduos ajustados. Todas as análises realizadas no presente estudo foram realizadas tendo o animal como unidade de análise, com exceção para a ocorrência de destruição periodontal, na qual a face foi unidade de análise. A avaliação estatística foi realizada em Stata® 10.1 para Macintosh (Stata®, College Station, Texas, EUA). O nível de significância estabelecido foi $P < 0,05$.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in rats

Harry Juan Rivera Oballe^a

Tobias Rauber Spuldaro^a

Eduardo José Gaio^{a,*}

Juliano Cavagni^a

Rosane Gomez^b

Cassiano Kuchenbecker Rösing^a

^aDepartment of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Corresponding Author:**

Eduardo José Gaio

Rua Ramiro Barcelos, 2492

Porto Alegre/RS, Brazil

ZIP Code: 90035-003

Phone Fax: +55 51 33085318

Email: dudagaio@hotmail.com

Running title: Alcohol and/or tobacco on spontaneous alveolar bone loss

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to evaluate the effect of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.

Design: 24, male, 60 days-old, Wistar rats were assigned to four groups: Group 1 received 10 mL/kg of glucose solution (5%). Group 2 received 2 g/kg alcohol (20%). Group 3 was exposed to tobacco smoke (6 cigarettes/60 min). Group 4 received both interventions of groups 2 and 3. Alcohol was given by gastric gavage and cigarette exposure was performed using a forced ventilation chamber. After 30 days, animals were sacrificed and the upper maxillae removed and defleshed. Morphometric analysis of alveolar bone loss (ABL) around the second molar was performed in standardized digital photographs. Analysis was conducted using paired t-test, one-way ANOVA and occurrence of spontaneous periodontal disease (ABL \geq 0.39 mm) was analyzed by Fisher's exact test.

Results: Significant differences in body weight were observed between all groups. Group 2 presented higher body weight as compared to the 3 other groups at 4 weeks ($P \leq 0.05$). Mean ABL values were 0.31 mm (± 0.08), 0.29 mm (± 0.07), 0.33 mm (± 0.10), and 0.33 mm (± 0.08) for groups 1, 2, 3, and 4, respectively. No significant differences were found among groups. In the analysis of occurrence of periodontal breakdown, alcohol exposure decreased the occurrence of ABL and cigarette exposure increased ABL. The combination of alcohol and cigarette exposure did not differ from the control group.

Conclusions: Light to moderate alcohol consumption decreased the occurrence of periodontal breakdown, while tobacco increased this rate.

Keywords: Alcohol; Smoking; Periodontitis; Periodontal disease; Rats

1 Introduction

Alcohol and tobacco are drugs widely consumed throughout the world and have attracted human concernment for years. High degrees of consumption can place the health of the individual at risk for a series of diseases. According to the World Health Organization, these drugs are associated with different chronic diseases, like cardiovascular diseases (arterial hypertension, stroke, arrhythmia) and cancer.¹ However, when the consumption of these substances is considered light/moderate, recent studies have shown different and intriguing results on health. While the relationship between the consumption of tobacco and chronic diseases is considered dose-dependent, light to moderate alcohol intake appears to offer a protective effect on immunity, besides strengthening the inflammatory system. Therefore, the consumption of alcohol seems to present a U- or J-shaped curve related to risk for related-diseases.²

Microbial biofilms, mainly gram-negative bacteria, are foremost contributors to the development of periodontal diseases. Furthermore, emerging evidence supports a role of systemic factors in the progression of periodontal disease. Several studies suggest that smoking, glucose disorders, obesity and alcohol abuse might contribute to the development of periodontal diseases.^{3,4,5} However, studies in humans and in animals have shown that light to moderate alcohol consumption seems to have a beneficial impact on the immune response, as well as infectious and inflammatory processes.^{6,7,8} Nevertheless, the biological mechanisms between possible protective effects of alcohol on the periodontium remain not completely understood. On the other hand, clinical and epidemiologic studies consistently find that tobacco exposure is linked with imbalance in cytokine production and T-cell subsets, changes associated with poor periodontal health. The literature suggests that tobacco is a major risk factor for periodontal diseases and probably the most important.⁴

Studies evaluating the occurrence of spontaneous alveolar bone loss by morphometric assessment related to alcohol and/or tobacco consumption are nonexistent. Therefore, the present study is warranted. The hypothesis to be tested in the present study is: (i) rats exposed to light to moderate alcohol consumption may present lower occurrence of periodontal breakdown than rats not exposed to alcohol; (ii) rats exposed to tobacco may present higher occurrence of periodontal breakdown than rats not exposed to tobacco; and (iii) rats exposed simultaneously to alcohol and tobacco may present a different pattern of occurrence of periodontal breakdown than a control group. The aim of present study was to assess the occurrence of spontaneous periodontal breakdown in Wistar rats exposed to alcohol and/or tobacco.

2 Materials and methods

2.1 Study design

This is a prospective, controlled, and blinded animal model study. The study protocol was submitted and approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Brazil (protocol number 19566). The protocol complies with the regulations set down by the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO – January 27, 1978) and the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS). All necessary procedures to minimize pain and discomfort were carried out by the researchers.

2.2 Animals and experimental procedures

Twenty-four, male, Wistar rats (weighting approximately 290 g) were used in the present study. Animals were housed in groups of 3 under a light/dark cycle of 12 h and room temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) with free access to water and rat chow. The liquid and solid intake as well as body weight was monitored during the study. The animals were distributed in four groups and all experimental procedures lasted 4 weeks.

Group 1 (Control Group; N = 6): animals received 10 mL/kg of glucose solution (5%) by gastric gavage, twice a day.

Group 2 (Alcohol Group; N = 6): animals received 2 g/kg of alcohol solution (20%) by gastric gavage, twice a day.

Group 3 (Tobacco Group; N = 6): animals receiving 6 cigarettes by inhalation during 60 min and 10 mL/kg of glucose solution (5%) by gastric gavage, twice a day.

Group 4 (Alcohol+Tobacco Group; N = 6): animals received the same intervention of groups 2 and 3, twice a day. Alcohol solution was administrated before the start of the exposure to cigarette smoke.

In order to expose animals to the same effects of stress, groups 1 and 2 stayed during the identical time of groups 3 and 4 in the forced ventilation chamber, although without cigarette smoke. Daily, all experimental groups started experimental procedures at 09 AM and 14 PM.

2.3 Glucose and alcohol solution

The glucose solution (5%) was prepared by diluting 5 grams of glucose in 100 mL of distilled water. Alcohol solution was prepared diluting alcohol (99%) in glucose solution (5%) in order to obtain a solution containing 20% alcohol (weight/volume). This concentration of glucose was successfully used in rats to increase the absorption of alcohol in relation to the self-administration is tested.⁹

2.4 Forced ventilation chamber

To administrate the inhalatory cigarette smoke to groups 3 and 4, a ventilation chamber was built. It consisted of a glass transparent cage (50x50x30 cm), completely closed except for two holes that allowed the air inlet and outlet that was kept in constant flow of 10 L/min.¹⁰ The entry hole of the box was connected to a small apparatus which allowed burning of cigarettes and drag of smoke inside the chamber by vacuum pump coupled to the exit hole. The burning of a cigarette took approximately 10 minutes. For purpose of no intoxication, 10-minute intervals were used without burning cigarettes. Thus, the whole smoke inhalation period lasted for approximately two hours. Groups 1 and 2 remained the same time, in a similar glass transparent cage, but without exposure to cigarette smoke.

2.5 Morphometric analysis

The morphometric analysis was performed by standard digital photographs.^{11,12} Pictures were taken using a 6.1 megapixel digital camera (Nikon™ Coolpix, Ayutthaya, Thailand) coupled to a tripod and equipped with 100 mm macro-lenses with minimal focal distance. Specimens were fixed to an endodontic ruler, parallel to the ground. Photographs of the buccal and palatal aspects of right and left hemimaxillae were taken.

A calibrated examiner performed the measurements of the linear distances from the cemento-enamel junction to the bone crest, using Adobe Photoshop™ CS4 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). An external researcher kept group distribution, in order to warrant blindness of the examiner. Five measurements were performed on each surface of the second molar both buccally and palatally (two on the distal root, two on the mesial root and one on the furcation). The measurements in pixels were then converted into millimeters using the markings of the endodontic ruler to which the hemimaxillae were attached as reference. All procedures for specimen preparation, photographs as well as morphometric

analysis were performed at the Laboratory of Periodontology of the Federal University of Rio Grande do Sul and followed the methods described by Fernandes et al.¹¹

2.6 Definition of spontaneous periodontal breakdown

The primary outcome of the present study was the occurrence of spontaneous periodontal breakdown. For that, a cut-off point was established, in order to define the occurrence of periodontal breakdown. An analysis of data from the control group was performed and the 75th percentile was considered the cut-off point. Thus, measurements ≥ 0.39 mm were considered as spontaneous periodontal breakdown.

2.7 Statistical analysis and reproducibility

Shapiro-Wilk test for normality was used and a normal distribution was detected in all continuous variables. Mean body weight was calculated and compared by paired t-test (intragroup analysis) and ANOVA (intergroup analysis). Mean and standard deviation of the distance from the CEJ to the alveolar bone crest and consumption of food for different groups were calculated and compared by ANOVA. Sites classified as positive for periodontal disease occurrence were compared between groups by Fisher's test and interpreted by adjusted residuals. All analyses conducted in the present study were performed using the animal as the unit of analysis, except for the occurrence of periodontal breakdown, in which the site was analyzed. Statistical analyses were performed in Stata 10.1 for Macintosh (StataTM, College Station, TX, USA). The level of significance was set as 0.05.

Twelve pictures for the morphometric analysis were randomly selected to be double-measured with a one-week interval. The intra-class correlation coefficient (ICC) between measurements was 0.93.

3 Results

Figure 1 shows the mean body weight for the 4 experimental groups at baseline and after 4 weeks. Body weight of animals at baseline was of approximately 290 g, with no statistically significant difference between groups. After 4 weeks of exposure to regular diet, alcohol and/or tobacco a statistically significant difference in body weight was observed in all groups. Furthermore, the animals exposed only to alcohol presented statistically significant

higher mean body weight as compared to control and tobacco groups at 4 weeks. No statistically significant difference was observed between alcohol+tobacco exposure and the other groups.

Throughout the study, it can be observed that there was a significant decrease in food consumption in all groups, except for rats in the tobacco group (Fig. 2). However, there were no significant differences between experimental groups in food consumption (g/day/rat) at any time of the experiment. Mean (\pm SD) alveolar bone loss was 0.31 mm (\pm 0.08), 0.29 mm (\pm 0.07), 0.33 mm (\pm 0.10), and 0.33 mm (\pm 0.08) for control, alcohol, tobacco and alcohol+tobacco groups, respectively (ANOVA). No significant differences were observed between groups ($P = 0.32$).

The main outcome of the present study is demonstrated in Figure 3. In animals submitted to alcohol, only 1 site was classified as experiencing spontaneous periodontal breakdown. However, tobacco and alcohol+tobacco groups exhibited 9 and 4 sites with spontaneous periodontal breakdown, according to the present cut-off point, respectively. A statistically significant difference between groups was detected ($P = 0.03$). The interpretation of the analysis by adjusted residuals demonstrated that there is a positive association between alcohol and absence of spontaneous periodontal disease. On the other hand, there is a positive association between tobacco and presence of spontaneous periodontal breakdown. Furthermore, there is no association between alcohol+tobacco with spontaneous periodontal breakdown.

4 Discussion

The present study assessed the occurrence of spontaneous periodontal breakdown in Wistar rats exposed to alcohol and/or tobacco. The results showed that light to moderate alcohol consumption was associated with a decrease in the occurrence of periodontal breakdown, while tobacco was related with an increase in this rate. The main novelty of this study is to assess the combined effect of two known risk factors to periodontal diseases on spontaneous alveolar bone loss.

In order to put the results of the present study into perspective, some methodological considerations are warranted. The present study evaluated spontaneous periodontal breakdown in Wistar rats. The emerging literature has started to pay closer attention to the spontaneous periodontal destruction both looking at the control sides of animals,¹³ as well as performing studies without induction of periodontal disease.^{12,14} This is related to the fact that the placement of ligatures or the induction by bacterial strains (e.g., *Porphyromonas*

gingivalis) combined or not with ligatures may promote an acute inflammation model which might not be equivalent to the process of chronic disease development in humans.^{15,16} Therefore, it could be supposed that looking at spontaneous periodontal breakdown could increase the translational potential of the study. Additionally, this kind of study gives supplementary information to the previously published articles with induced-breakdown, since the extra challenge is not present.

Additionally, the present study tried to follow best-laboratory research practice, especially concerning blindness of the examiner, reliability and consistency of the assessments, trying to avoid bias.¹⁷ Moreover, in the present study, similarly to different approaches that have been performed in clinical and epidemiological research, the establishment of a cut-off point for definition of periodontal breakdown occurrence appears to be an attractive way to consider the data. In this approach, by means of data distribution and considering the results of the control group, the 75th percentile was used to determine a dichotomic way of looking at disease occurrence.^{12,18,19}

In the present study, two risk factors for periodontal diseases are considered *per se* and combined: alcohol and smoking. If in one hand, the literature is virtually unanimous in demonstrating the deleterious effect of smoking on the periodontium,⁴ in the other, the literature concerning alcohol exposure is still controversial.^{5,13,20} Therefore, animal models are one of the most adequate ways of understanding these facts. The inconsistent results concerning the effects of alcohol intake might be explained by some facts. The way the experiments are planned, especially time of administration of alcohol and dose may account for the contradictory results. Souza et al.²¹ reported that a self-administration of 20% ethanol during 8 weeks did not alter alveolar bone loss morphometrically in female Wistar rats without ligature, but increased significantly alveolar bone loss in rats submitted to ligature-induced periodontitis. Recently, Dantas et al.²² showed that rats that received 2 g/kg of alcohol (25%) by gastric gavage twice a day during 7 days, presented a statistically significant difference in the histological ligament height (furcation area) as compared to rats that received water. On the other hand, significant differences between groups were not observed when the alveolar bone volume was analyzed. However, a study performed by our group reported that low concentration alcohol intake (5%) during 9 weeks inhibited spontaneous alveolar bone loss in rats, and did not affect the alveolar bone loss in ligature-induced periodontal breakdown.¹³

Epidemiological studies also found controversial results. Lages et al.²² demonstrated that the occurrence of periodontitis amongst alcoholics was high and the frequency of alcohol consumption increased the odds of periodontitis. However, other epidemiological studies with

representative samples also observed a protective effect against clinical attachment loss in light to moderate alcohol drinkers compared to non-drinkers and heavy drinkers.^{20,24}

In the present study, the concentration of alcohol used mimics the amount of alcohol used by light-moderate drinkers.^{25,26,27} There are some plausible pathways by which light to moderate amounts of alcohol can protect the alveolar bone from destruction. One of the hypotheses relates to a reduction of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6 and C-reactive protein.²⁸ In a recent review, Diaz et al.² stated that moderate alcohol consumption seems to have a better impact on the immune system than excessive or absence of consumption. Additionally to the anti-inflammatory effect and the possible benefits on host immune-competence, the eventual antimicrobial effect in dental plaque could also explain the better periodontal status observed in light to moderate drinkers.

Another important aspect of the present study is the observation of the effect of smoking on periodontal breakdown. Epidemiological studies consistently demonstrate the association between smoking and periodontal diseases^{3,4} Also, animal studies clearly demonstrate the effect of smoking on periodontal diseases.²⁹ The mechanism by which this effect is observed relates to neutrophil dysfunction causing reduction on phagocytic capacity, vasoconstriction, reduced levels of immunoglobulins, cytokines, enzymes, fibroblast dysfunction, among others.^{30,31} The results found in our study confirm the knowledge present in the literature, reinforcing that the model is adequate to study periodontal breakdown.

One of the important aspects of the present study is that the combined effect of alcohol and smoking has not been extensively studied in relation to periodontal diseases. It is well-known that this combination leads to higher chances of oral cancer.³² The pre-stated hypothesis of the present study leads to the expectation of a different pattern of periodontal destruction in rats exposed both to moderate concentration of alcohol and smoke. To our surprise, the results point out for a different situation. Rats exposed to both risk factors did not present higher degrees of periodontal breakdown. The possible explanation for this finding is that the well-known negative effects of smoking were at least partially neutralized by the anti-inflammatory properties of the used concentration of alcohol. The interpretation of this result should be performed with extreme caution, since it should not be conceivable to translate that alcohol would diminish the deleterious effect of smoking. It should be remembered that both exposures are related to other health problems and this is the most important information to be given.

Another important fact that should be given importance relates to the general health status of the animals. Body weight was used as a proxy of general health and no important differences were detected among groups. It should be remembered that alcohol was given

together with glucose to increase palatability. The food ingestion, although varied, did not differ in the beginning and end of the experiment, suggesting that this would not be related to any of the findings. Also, the time of the experiment is probably not sufficient to generate the most impacting health problems that are known to be present both for alcohol and smoke.

The present study has some limitations. No data were collected with regard to the blood level of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α and Interleukins. However, this could only be used as explanatory variables. The main outcome chosen for the study, which is meant to have a meaning related to disease occurrence clearly demonstrated that smoking is deleterious and that moderate consumption of alcohol might be protective. Clinical studies suggest that periodontitis increases the blood level of these cytokines,^{33,34} it is possible that a similar effect may also be present in the periodontitis rat model. In summary, the present study reveals that smoking is deleterious for the occurrence of periodontal breakdown, while light-moderate alcohol intake tends to protect periodontal breakdown. Combination of alcohol and tobacco smoking does not seem to negatively affect the periodontium of Wistar rats.

REFERENCES

1. WHO. World Health Organization – Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010. Geneva, 2011. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf
2. Diaz LE, Montero A, Gonzalez-Gross M, Vallejo AI, Romeo J, Marcos A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002;**56**(Suppl 3):S50–3.
3. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *Journal of Periodontology* 2004;**75**(7):1033–41.
4. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000* 2013;**62**(1):59–94.
5. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Clinical Periodontology* 2004;**31**(7):484–8.
6. Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, et al. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *European Heart Journal* 2004;**25**(23):2092–100.
7. Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Archives of Internal Medicine* 2006;**166**(22):2437–45.
8. Rao MN, Marmillot P, Palmer DA, Seeff LJ, Strader DB, Lakshman MR. Light, but not heavy alcohol drinking stimulates paraoxonase by up regulating liver PON mRNA in both rats and humans. *Metabolism: clinical and experimental* 2003;**52**(10):1287–94.
9. Matthews DB, Overstreet DH, Rezvani AH, Devaud LL, Morrow AL. Effects of sweetened ethanol solutions on ethanol self-administration and blood ethanol levels. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 2001;**68**(1):13–21.
10. Ebersbach-Silva P, Alves T, Fonseca AT, Oliveira MA, Machado UF, Seraphim PM. Cigarette smoke exposure severely reduces peripheral insulin sensitivity without changing GLUT4 expression in oxidative muscle of Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 2013;**57**(1):19–26.
11. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rösing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research* 2007;**21**(3):216–21.
12. Cavagni J, Wagner TP, Gaio EJ, Rêgo RO, Torres IL, Rösing CK. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Archives of Oral Biology* 2013;**58**(8):1034–9.
13. Liberman DN, Pilau RM, Gaio EJ, Orlandini LF, Rösing CK. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Archives of Oral Biology* 2011;**56**(2):109–13.

14. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *Journal of Periodontal Research* 2003;**38**(6):543-50.
15. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *Journal of Periodontology* 2007;**78**(6):1120–8.
16. Tomofuji T, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Maruyama T, et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. *Archives of Oral Biology* 2008;**53**(12):1113–8.
17. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthi I, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Veterinary Clinical Pathology* 2010;**41**(1):27–31.
18. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs Jr DR, et al. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004. *Diabetes Care* 2012;**35**(11):2235–42.
19. Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case–control study. *Journal of Periodontology* 2009;**80**(11):1742–9.
20. Kongstad J, Hvidtfeldt UA, Gronbaek M, Jontell M, Stoltze K, Holmstrup P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen city heart study. *Journal of Clinical Periodontology* 2008;**35**(12):1032–9.
21. Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian of Oral Research* 2009;**23**(3):326–32.
22. Dantas AM, Mohn CE, Burdet B, Zorrilla Zubilete M, Mandalunis PM, Elverdin JC, et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. *Archives of Oral Biology* 2012;**57**(9):1211–7.
23. Lages EJ, Costa FO, Lages EM, Cota LO, Cortelli SC, Nobre-Franco GC, et al. Risk variables in the association between frequency of alcohol consumption and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2012;**39**(2):115–22.
24. Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of Periodontology* 2006;**77**(3):479–89.
25. Pautassi RM, Myers M, Spear LP, Molina JC, Spear NE. Ethanol induces second-order aversive conditioning in adolescent and adult rats. *Alcohol* 2011;**45**(1):45–55.
26. Green JT, Arenos JD, Dillon CJ. The effects of moderate neonatal ethanol exposure on eyeblink conditioning and deep cerebellar nuclei neuron numbers in the rat. *Alcohol* 2006;**39**(3):135–50.

27. Probyn ME, Parsonson KR, Gardebjer EM, Ward LC, Wlodek ME, Anderson ST, et al. Impact of low dose prenatal ethanol exposure on glucose homeostasis in Sprague-Dawley rats aged up to eight months. *PLoS One* 2013;**8**(3):e59718.
28. Marques-Vidal P, Bochud M, Bastardot F, von Känel R, Ferrero F, Gaspoz JM, et al. Associations between alcohol consumption and selected cytokines in a Swiss population-based sample (CoLaus study). *Atherosclerosis* 2012;**222**(1):245–50.
29. Nogueira-Filho GR, Rosa BT, César-Neto JB, Tunes RS, Tunes UR. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology* 2007;**78**(4):730–5.
30. Bouclin R, Landry RG, Noreau G. The effects of smoking on periodontal structures: a literature review. *Journal Canadian Dental Association* 1997;**63**(5):360–3.
31. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology* 2005;**32** (Suppl 6):180–95.
32. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2004;**108**(5):741–9.
33. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 1998;**33**(4):212–25.
34. de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Socransky SS, Teles RP. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* 2012;**39**(3):295–302.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Mean body weight (g) for each experimental group.

*Paired t Test - Intragroup differences; **ANOVA - Intergroup differences

Figure 2 - Mean food intake (g/day/rat) throughout the study according to the experimental groups.

Figure 3 – Occurrence of alveolar bone loss (mm) according to experimental groups after utilization of a cut-off point $\geq 0.39\text{mm}$ (75th percentile).

Figures

Figure 1.

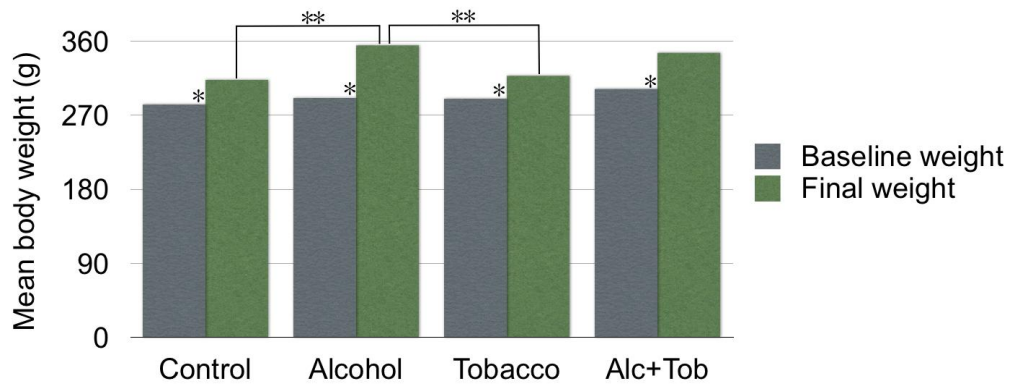


Figure 2.

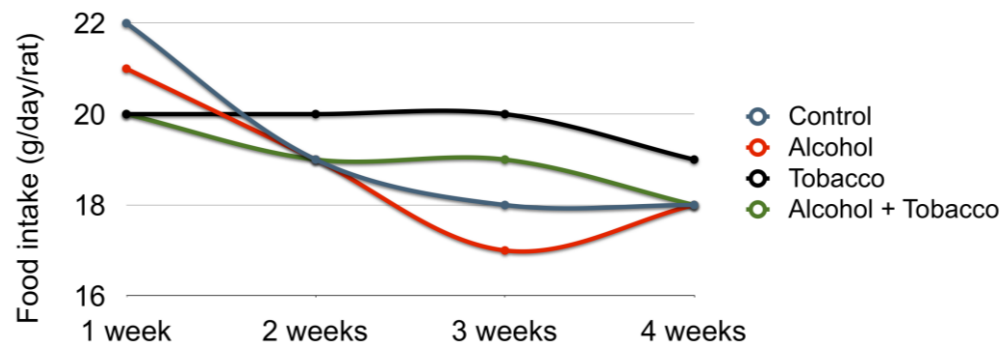
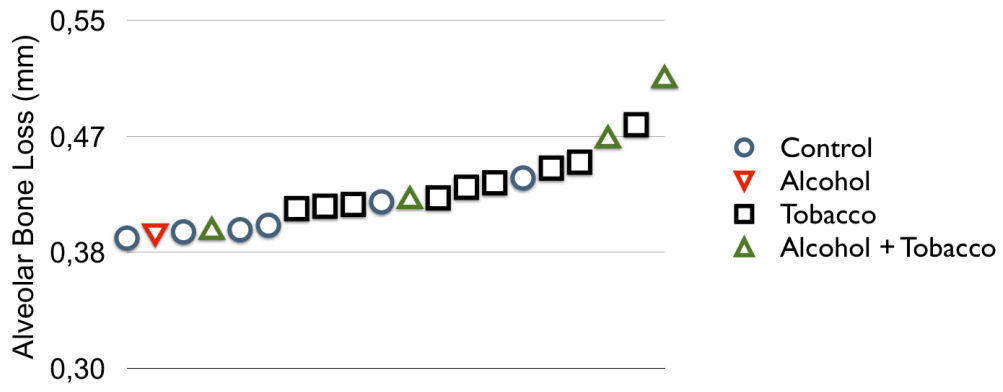


Figure 3.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação objetivou avaliar, em modelo animal, as possíveis influências do álcool e do tabaco, isolados ou combinados, sobre a perda óssea alveolar espontânea. A justificativa para a realização do presente estudo baseia-se na clara associação epidemiológica e de resposta ao tratamento entre fumo e doenças periodontais e o corpo crescente de evidências que associa, de forma ainda controversa, o consumo de álcool e as doenças periodontais.

Para tanto, observando um controle maior dos supostos fatores modificadores, um modelo de estudo em animal é necessário e ratos Wistar foram escolhidos, uma vez que são amplamente utilizados em pesquisas relacionadas à etiopatogênese da destruição periodontal. No presente modelo, tendo em vista um projeto maior onde este sub-projeto está inserido, optou-se por observar a perda óssea espontânea, que tem sido objeto de estudo com diferentes fatores modificadores.

Também é importante ressaltar que, no presente estudo, uma forma inovadora de análise da perda óssea alveolar foi utilizada, definindo-se um ponto de corte para a ocorrência de destruição periodontal. Esse tipo de análise pode ser uma forma útil de se trabalhar dados de estudos sobre destruição periodontal em modelos animais.

Os resultados aqui apresentados em relação à exposição ao tabaco, confirmaram a tendência clara na literatura, com maior destruição periodontal nos animais expostos a esse que é considerado um verdadeiro fator de risco às doenças periodontais. No que concerne à exposição ao álcool, a dose moderada utilizada (20%), no presente estudo esteve relacionada a menores graus de destruição periodontal, confirmando resultados de um outro estudo do grupo de pesquisa (LIBERMAN et al., 2010). Entretanto, um dos achados mais significativos e surpreendentes do presente estudo relaciona-se à combinação de ambos os fatores. Ao início, hipotetizou-se observar diferenças, mas não se tinha clara em que sentido essa diferença aconteceria. Os resultados sugerem que aparentemente os efeitos deletérios da exposição à fumaça do cigarro tendem a ser minimizados pela exposição a doses moderadas de álcool.

De maneira alguma os resultados do presente estudo devem ser extrapolados para a clínica, com a indicação de que o consumo de álcool possa beneficiar fumantes. Esses achados somente corroboram o entendimento do possível papel antiinflamatório de doses baixas a moderadas de álcool. Essas evidências são consistentes com evidências de estudos em outros sistemas do organismo. Acrescente-se a isso o fato de que não se pode ignorar os demais problemas relacionados ao consumo de álcool, quando esse é exagerado e, sendo este uma substância psicoativa, pode gerar outros problemas de mais difícil controle, como, por exemplo, a adição.

Nesse sentido, os resultados do presente estudo permitem concluir que exposição à fumaça do cigarro e ao álcool são potenciais modificadores da condição periodontal. Claramente os malefícios do cigarro ao periodonto são detectados e a relação entre álcool e destruição periodontal continua sendo objeto de necessidade de estudos futuros, com doses diferenciadas, para que se possa estabelecer seu papel na cadeia causal das periodontites.

REFERÊNCIAS

- Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol* 2000, v.29, p.31-69. 2002.
- Albandar JM., et al. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol*, v.71, n.12, Dec, p.1874-81. 2000.
- Alexander AG. The relationship between tobacco smoking calculus and plaque accumulation and gingivitis. *Dent Health (London)*, v.9, n.1, Jan-Mar, p.6-9. 1970.
- Amaral Cda, SR et al. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol*, v.79, n.6, Jun, p.993-8. 2008.
- Arora, M., *et al.* Cigarette smoking and tooth loss in a cohort of older Australians: the 45 and up study. *J Am Dent Assoc*, v.141, n.10, Oct 2010, p.1242-9.
- Baab, DA. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *J Clin Periodontol*, v.14, n.7, Aug, p.418-24. 1987.
- Benowitz, NL. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.36, p.597-613. 1996.
- Bergstrom J. Bostrom L Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol*, v.28, n.7, Jul, p.680-5. 2001.
- Bergstrom JS et al. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*, v.71, n.8, Aug, p.1338-47. 2000.
- Bergstrom J. e Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*, v.65, n.5 Suppl, May, p.545-50. 1994.
- Bhagyajyothi CS. e Pushpanjali K. Assessment and comparison of periodontal status among young smokers and nonsmokers of Bangalore, India--a cross sectional study. *Community Dent Health*, v.28, n.1, Mar 2011, p.89-94.
- Boyadjieva, NI. et al. Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, v.26, n.11, Nov, p.1719-27. 2002.
- Cuff, MJ., et al. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol*, v.60, n.10, Oct, p.564-9. 1989.
- D'aiuto FL, et al. Periodontal therapy: a novel non-drug-induced experimental model to study human inflammation. *J Periodontal Res*, v.39, n.5, Oct, p.294-9. 2004.
- Dantas AM., et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. *Arch Oral Biol*, v.57, n.9, Sep 2012, p.1211-7.
- Diaz LE., et al. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr*, v.56 Suppl 3, Aug, p.S50-3. 2002.

Fiorini TM. et al. Is There a Positive Effect of Smoking Cessation on Periodontal Health? A Systematic Review. J Periodontol, Apr 2013.

Genco RJ. e W. Borgnakke S Risk factors for periodontal disease. Periodontol 2000, v.62, n.1, Jun 2013, p.59-94.

Gomes, S. C., C. Nonnenmacher, *et al.* The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol, v.79, n.12, Dec, p.2297-304. 2008.

Grossi, S. G., R. J. Genco, *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. J Periodontol, v.66, n.1, Jan, p.23-9. 1995.

Grossi, S. G., J. J. Zambon, *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol, v.65, n.3, Mar, p.260-7. 1994.

Haas, A. N., E. J. Gaio, *et al.* Pattern and rate of progression of periodontal attachment loss in an urban population of South Brazil: a 5-years population-based prospective study. J Clin Periodontol, v.39, n.1, Jan 2011, p.1-9.

Heasman, L., F. Stacey, *et al.* The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. J Clin Periodontol, v.33, n.4, Apr, p.241-53. 2006.

Imhof, A., M. Woodward, *et al.* Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). Eur Heart J, v.25, n.23, Dec, p.2092-100. 2004.

Irie, K., T. Tomofuji, *et al.* Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. J Dent Res, v.87, n.5, May, p.456-60. 2008.

Ismail, A. I., B. A. Burt, *et al.* Epidemiologic patterns of smoking and periodontal disease in the United States. J Am Dent Assoc, v.106, n.5, May, p.617-21. 1983.

James, J. A., N. M. Sayers, *et al.* Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol, v.70, n.5, May, p.518-25. 1999.

Jansson, L. Association between alcohol consumption and dental health. J Clin Periodontol, v.35, n.5, May, p.379-84. 2008.

Javed, F., A. Al-Rasheed, *et al.* Effect of cigarette smoking on the clinical outcomes of periodontal surgical procedures. Am J Med Sci, v.343, n.1, Jan 2011, p.78-84.

Jernigan, D. H., M. Monteiro, *et al.* Towards a global alcohol policy: alcohol, public health and the role of WHO. Bull World Health Organ, v.78, n.4, p.491-9. 2000.

Johnson, B. D. e D. Engel. Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A review of diagnosis, etiology and treatment. *J Periodontol*, v.57, n.3, Mar, p.141-50. 1986.

Kazor, C., G. W. Taylor, *et al.* The prevalence of BANA-hydrolyzing periodontopathic bacteria in smokers. *J Clin Periodontol*, v.26, n.12, Dec, p.814-21. 1999.

Kongstad, J., U. A. Hvidtfeldt, *et al.* Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Perio**-dontol*, v.35, n.12, Dec, p.1032-9. 2008.

Kowolik, M. J. e T. Nisbet. Smoking and acute ulcerative gingivitis. A study of 100 patients. *Br Dent J*, v.154, n.8, Apr 23, p.241-2. 1983.

Krall, E. A., T. Dietrich, *et al.* Risk of tooth loss after cigarette smoking cessation. *Prev Chronic Dis*, v.3, n.4, Oct, p.A115. 2006.

Lages, E. J., F. O. Costa, *et al.* Risk variables in the association between frequency of alcohol consumption and periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.39, n.2, Feb 2011, p.115-22.

Liberman, D. N., R. M. Pilau, *et al.* Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral Biol*, v.56, n.2, Feb 2010, p.109-13.

Loos, B. G., M. T. Roos, *et al.* Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. *J Periodontol*, v.75, n.4, Apr, p.557-64. 2004.

Mackay, J. The role of research on the development and implementation of policy. *Nicotine Tob Res*, v.15, n.4, Apr 2012, p.757-60.

Malhotra, R., A. Kapoor, *et al.* Nicotine and periodontal tissues. *J Indian Soc Periodontol*, v.14, n.1, Jan 2010, p.72-9.

Meekin, T. N., R. F. Wilson, *et al.* Laser Doppler flowmeter measurement of relative gingival and forehead skin blood flow in light and heavy smokers during and after smoking. *J Clin Periodontol*, v.27, n.4, Apr, p.236-42. 2000.

Mendenhall, C. L., S. A. Theus, *et al.* Biphasic in vivo immune function after low-versus high-dose alcohol consumption. *Alcohol*, v.14, n.3, May-Jun, p.255-60. 1997.

Mendenhall, C. L., S. A. Theus, *et al.* Biphasic in vivo immune function after low-versus high-dose alcohol consumption. *Alcohol*, v.14, n.3, May-Jun, p.255-60. 1997.

Morozumi, T., T. Kubota, *et al.* Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, v.31, n.4, Apr, p.267-72. 2004.

Offenbacher, S. e J. D. Beck. Periodontitis: a potential risk factor for spontaneous preterm birth. *Compend Contin Educ Dent*, v.22, n.2 Spec No, p.17-20. 2001.

- Okamoto, Y., S. Tsuboi, *et al.* Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *J Periodontol Res*, v.41, n.6, Dec, p.560-6. 2006.
- Palmer, R. M., R. F. Wilson, *et al.* Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol*, v.32 Suppl 6, p.180-95. 2005.
- Papapanou, P. N. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*, v.1, n.1, Nov, p.1-36. 1996.
- Pereira, R. S., C. N. Hasimoto, *et al.* Intestinal healing in rats submitted to ethanol ingestion. *Acta Cir Bras*, v.27, n.3, Mar 2012, p.236-43.
- Persson, L., J. Bergstrom, *et al.* Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *J Periodontol*, v.74, n.10, Oct, p.1475-82. 2003.
- Pindborg, J. J. Tobacco and gingivitis. *J Dent Res*, v.26, n.3, Jun 1974, p.261: passim. 1947.
- Pitiphat, W., A. T. Merchant, *et al.* Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res*, v.82, n.7, Jul, p.509-13. 2003.
- Preshaw, P. M., L. Heasman, *et al.* The effect of quitting smoking on chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.32, n.8, Aug, p.869-79. 2005.
- Reidy, A. Cancer-related fatigue: physical assessment is not enough. *Br J Nurs*, v.20, n.17, Sep 2011, p.S32-4, S36-9.
- Romeo, J., J. Warnberg, *et al.* Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem*, v.63, n.2, Jun, p.153-9. 2007.
- Rosa, E. F., P. Corraini, *et al.* A prospective 12-month study of the effect of smoking cessation on periodontal clinical parameters. *J Clin Periodontol*, v.38, n.6, Jun 2011, p.562-71.
- Romeo, J., J. Warnberg, *et al.* Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann Nutr Metab*, v.51, n.4, p.359-66. 2007.
- Sheiham, A. Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. *J Periodontol*, v.42, n.5, May, p.259-63. 1971.
- Souza, D. M. e R. F. Rocha. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. *Braz Oral Res*, v.23, n.4, Oct-Dec, p.460-6. 2009.
- Susin, C., C. F. Dalla Vecchia, *et al.* Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*, v.75, n.7, Jul, p.1033-41. 2004.

Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*, v.34, n.6, Nov-Dec, p.830-41. 1999.

Thakker, K. D. An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, v.22, n.7 Suppl, Oct, p.285S-298S. 1998.

Thomson, W. M., J. M. Broadbent, *et al.* Cigarette smoking and periodontal disease among 32-year-olds: a prospective study of a representative birth cohort. *J Clin Periodontol*, v.34, n.10, Oct, p.828-34. 2007.

Thomson, W. M., G. D. Slade, *et al.* Incidence of periodontal attachment loss over 5 years among older South Australians. *J Clin Periodontol*, v.31, n.2, Feb, p.119-25. 2004.

Topics/alcohol_drinking/en/. New York. Global Status Report on Alcohol and Health; 2011 em Febrery 11. Disponivel em <http://www.who.org>.

Topics/tobacco/en/ New York. Global Statutus Report on Tobacco on Health 2013 em May 15. Disponivel em <http://www.who.org>

Torrunguang, K., V. Gongsakdi, *et al.* Association between cigarette smoking and the intraoral distribution of periodontal disease in Thai men over 50 years of age. *J Investig Clin Dent*, v.3, n.2, May 2012, p.135-41.

Trevisiol, C. H., R. T. Turner, *et al.* Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*, v.41, n.2, Aug, p.175-80. 2007.

Varona, P., M. Chang, *et al.* Tobacco and alcohol use in Cuban women. *MEDICC Rev*, v.13, n.4, 2011, p.38-44.

Wan, C. P., W. K. Leung, *et al.* Effects of smoking on healing response to non-surgical periodontal therapy: a multilevel modelling analysis. *J Clin Periodontol*, v.36, n.3, Mar, p.229-39. 2009.

Warren, C. W., V. Lea, *et al.* Change in tobacco use among 13-15 year olds between 1999 and 2008: findings from the Global Youth Tobacco Survey. *Glob Health Promot*, v.16, n.2 Suppl, Sep, p.38-90. 2009.

Wender, R., E. T. Fontham, *et al.* American Cancer Society lung cancer screening guidelines. *CA Cancer J Clin*, v.63, n.2, Mar-Apr 2013, p.107-17.

Zambon, J. J., S. G. Grossi, *et al.* Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, v.67, n.10 Suppl, Oct, p.1050-4. 1996.