

EUGÊNIO JOSÉ PEREIRA LAGES

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MICROBIOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ALCOOLISMO
E PERIODONTITE**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2011

EUGÊNIO JOSÉ PEREIRA LAGES

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MICROBIOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ALCOOLISMO
E PERIODONTITE**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa (FO-UFMG)

Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli (UNITAU-SP)

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por incansavelmente acreditar em mim, pelo incentivo diário que percorreu a infância, me fez crescer e buscar minha vida e meu lugar no mundo. Dedico principalmente meu esforço à minha mãe, foi seu exemplo de que não há vitória sem luta, que me fez percorrer estes caminhos e também aos meus queridos sogros pelo incentivo e exemplo de que investir em nossa formação é o bem maior.

E como não poderia deixar ser,
para meus amores Beth, Luiza, Livia e Davi,
..... maior fonte de motivação.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos aos amigos – tanto aos “velhos” e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo.

Á Deus por sempre me iluminar e me guiar...

Ao meu amigo e estimado orientador Professor Fernando de Oliveira Costa. Sou imensamente grato por sua orientação que ultrapassa a tese, bem como sua total dedicação e disponibilidade. Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes simples gestos podem mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Ao meu estimado co-orientador Professor José Roberto Cortelli agradeço a oportunidade, ajuda imensurável e a confiança em mim depositada. Com ele tive a oportunidade de enriquecer meus conhecimentos.

Agradeço à FO-UFMG, ao Colegiado de Pós-Graduação e ao Professor José Eustáquio da Costa que sempre me receberam de braços abertos.

Ao laboratório de Biologia molecular da UFMG, na pessoa do Professor Ricardo Santiago Gomez pelo acesso e disponibilidade e ao João Riccieri de Brito pela dedicação e orientação na realização dos procedimentos moleculares.

À Professora Sheila Cavalca Cortelli e ao Professor Gilson César Nobre Franco pela disponibilização do laboratório de Patologia da UNITAU-SP e pelo apóio técnico-científico em todas as etapas desta pesquisa.

Aos funcionários dos Postos de Saúde (São Jorge, Ventosa e Oeste) e voluntários, sem vocês essa pesquisa não seria possível.

Às minhas secretárias Emanuele, Mariléia e Marilda, vocês são meu braço direito.

À Rosilene, Guilherme e Lucas pela compreensão e por compartilhar a atenção do Fernando em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos Luís Otávio e Renata Cyrino por fazerem com que essa caminhada fosse concluída de forma mais prazerosa possível.

As Professoras Vanessa Frazão Cury e Paula Moreira Rocha pelas preciosas sugestões durante a qualificação.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro para esta pesquisa.

RESUMO

As doenças periodontais reúnem um grupo de doenças infecciosas, que resultam da interação entre os biofilmes supra e subgingival e a resposta imuno-inflamatória gerada pelo hospedeiro. Diversos fatores e variáveis de risco podem interferir e modular a relação entre o desafio microbiano e a resposta do hospedeiro. Embora pouco investigado e com dados conflitantes o alcoolismo é um fator comportamental associado à doença periodontal. Adicionalmente, pouco se conhece sobre a sua interferência na resposta microbiana e imunológica frente à periodontite. Neste sentido, este estudo se justifica por buscar maiores esclarecimentos da influência do consumo de álcool na gravidade e susceptibilidade as doenças periodontais. Assim, esta pesquisa objetiva determinar as condições periodontais, perfil epidemiológico, microbiológico e imunológico entre usuários, dependentes e não dependentes de bebidas alcoólicas. Especificamente objetivou-se: a) determinar a prevalência de periodontite em uma população com diferentes níveis de consumo de bebida alcoólica; b) verificar a influência de variáveis de risco na associação entre uso de álcool e periodontite; c) determinar a presença e frequência dos periodontopatógenos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella Intermedia* (Pi), *Eikenella corrodens* (Ec), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) em não usuários e dependentes de álcool com periodontite; d) realizar a quantificação protéica de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1Beta (IL-1 β) no fluido gengival em não usuários e dependentes de álcool com periodontite. Este estudo será apresentado na forma de dois artigos científicos com delineamentos diferenciados: Estudo 1 - estudo transversal da associação de variáveis de risco na ocorrência de periodontite, entre indivíduos com diferentes níveis de consumo de bebida alcoólica, cuja amostra de conveniência foi composta por 542 indivíduos residentes na região oeste de Belo Horizonte - MG, Brasil. Estudo 2 - caso controle aninhado a partir do estudo transversal da quantificação de periodontopatógenos e citocinas pro-inflamatórias em indivíduos com periodontite dependentes e não usuários de bebidas alcoólicas. Resultados: o primeiro estudo mostrou uma relação positiva entre a frequência de álcool e a prevalência e gravidade da periodontite. Tabagismo e perda dental foram significativamente associados à ocorrência de periodontite. O segundo estudo não mostrou diferença entre os grupos na quantificação de TNF- α e IL-1 β , mas mostrou diferença significativa na frequência de três periodontopatógenos (Pi, Ec e Fn) entre os grupos. Conclusão: a prevalência de periodontite em usuários de álcool no estudo transversal foi alta e, de forma incremental, frequência e dependência ao álcool aumentaram a chance de ocorrência de periodontite, principalmente em fumantes. Adicionalmente, perda dental também foi associada à periodontite em todos os grupos usuários de álcool. O estudo caso-controle sugere que a dependência de bebidas alcoólicas pode alterar o equilíbrio microbiológico, aumentando significativamente a quantificação de Pi, Ec e Fn em usuários dependentes alcoólicos.

Palavras chave: Periodontite; alcoolismo; epidemiologia; periodontopatógenos; citocinas

ABSTRACT

The periodontal diseases together form a group of infectious inflammatory diseases, that result from the interaction between the supra- and subgingival biofilm and the inflammatory reaction generated by the host. Several risk factors and variables can interfere with and modulate the relationship between the microbial challenge and host response. Although poorly researched and with conflicting data, alcoholism is a behavioral factor associated with periodontal disease. Additionally, little is known about the interaction between the microbiological and immunological response towards periodontitis. Thus, this study is justified to seek further clarification of the influence of alcohol consumption on the severity of and susceptibility to periodontal diseases. Therefore, this study aims to determine the periodontal condition, epidemiological, microbiological and immunological profiles among users dependent and not dependent on alcohol. Specifically, the goals are to: a) to determine the prevalence of periodontitis in a population with different levels of alcoholic beverage consumption; b) to verify the influence of the risk variables associated with alcohol use and periodontitis; c) to determine the presence and frequency of the periodontal pathogens, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella Intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* in non-users and the alcoholically dependent with chronic periodontitis; d) to quantify the tumor necrosis factor-alpha protein (TNF- α) and IL-1 β , in the gingival fluid of non-users and the alcoholically dependent with chronic periodontitis. This study will be presented in the form of two scientific articles with differentiated focus: Study 1 - cross-sectional study of the association of risk variables in the occurrence of periodontitis among individuals with different levels of alcoholic beverage consumption, whose convenience sample consisted of 542 individuals living in the western region of Belo Horizonte - MG, Brazil. Study 2 - nested case-control study of the cross-quantification of periodontal pathogens and pro-inflammatory cytokines in subjects with chronic periodontitis who are dependent and not dependent on alcoholic beverages. Results: Study 1 showed a positive relationship between the frequency of alcohol, and the prevalence and severity of periodontitis. Smoking and tooth loss were significantly associated with the occurrence of periodontitis. Study 2 did not show a difference between the groups in the quantification of TNF- α and IL-1 β , but showed significant difference in the frequency of three periodontal pathogens (*Pi*, *Ec*, *Fn*) between the groups. Conclusion: the prevalence of periodontitis in alcohol users in the cross-sectional study was elevated and, incrementally, frequency and alcohol dependence increased the odds of occurrence of periodontitis, especially in smokers. The case-control study suggests that addiction to alcohol may alter the balance significantly increasing the quantity of *Pi*, *Ec* and *Fn* in the alcohol dependent users.

Key words: Periodontitis; alcoholism; epidemiology; periodontal pathogens

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AUDIT	Teste de identificação de distúrbio de uso de álcool
AAA	Associação dos alcoólatras Anônimos
CAGE	<i>Instrument cut-down, annoyed, guilty, eye-opener</i>
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DP	Doença periodontal
d.p.	Desvio-padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Ec	<i>Eikenella corrodens</i>
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
GN	Grupo nunca ou uso ocasional de álcool
GM	Grupo uso moderado de álcool
GI	Grupo uso intenso de álcool
GD	Grupo dependência alcoólica
GNP	Grupo nunca ou uso ocasional de álcool periodontite
GDP	Grupo dependente alcoólico periodontite
IC	Intervalo de confiança
IL-1 β	interleucina 1 β (IL-1 β)
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IP	Índice de placa
LPS	Lipopolissacarídeos
MMPs	Matriz metalo-proteinases
NCI	Nível clínico de inserção
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR-RT	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação de polimerase em cadeia em tempo real

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
PS	Profundidade de sondagem
RC	Razão de chance
RT	<i>Real Time</i>
ROC	<i>Curva de operação característica</i>
SS	Sangramento à sondagem
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SMB	Salário mínimo brasileiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	HIPÓTESES.....	18
5	ARTIGOS CIENTÍFICOS	19
	Estudo 1 - Variáveis de risco na associação entre consumo e frequência de álcool com periodontite	20
	Estudo 2 - Quantificação de periodontopatógenos e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com periodontite dependentes e não usuários de álcool	48
6	CONCLUSÕES.....	72
7	REFERÊNCIAS ADICIONAIS	73
8	ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais reúnem um grupo de doenças infecciosas, caracterizadas principalmente pela gengivite e periodontite, que resultam da interação entre os biofilmes supra e subgengival e a resposta imuno-inflamatória gerada pelo hospedeiro. As periodontites, como doenças destrutivas do periodonto, são caracterizadas por uma infecção com predomínio de microrganismos anaeróbios e Gram negativos, presentes no biofilme subgengival, e que representam uma fonte constante de agressão ao periodonto (PAGE e KORNMAN, 1997).

Baseado na identificação realizada tradicionalmente por meio de cultura bacteriana e, mais recentemente, pelo emprego de técnicas moleculares, mais de 700 espécies bacterianas têm sido identificadas na cavidade bucal. Deste universo microbiano, mais de 400 espécies são encontradas no interior de bolsas periodontais, sendo as 300 remanescentes encontradas em outros nichos incluindo língua, membrana mucosa, tecidos cariados e em infecções endodônticas (PASTER *et al.*, 2006). Existe ainda um dinâmico equilíbrio entre microrganismos comensais e bactérias patogênicas, que compõem este biofilme, protegendo esta organizada estrutura da eventual resposta de defesa do hospedeiro (SOCRANSKY; SMITH; HAFFAJEE, 2002).

A resposta do hospedeiro, ou especificamente, a resposta imunológica frente à presença e agressão dos microrganismos está condicionada à liberação de mediadores inflamatórios associados aos produtos da degradação tecidual. Assim, os periodontopatógenos produzem diversos fatores que podem estimular as células do hospedeiro a ativar uma variedade de respostas que levam à produção de potentes mediadores inflamatórios, tais como, o metabólico do ácido araquidônico,

prostaglandina E₂, enzimas como matriz metalo-proteinasas (MMPs) e as citocinas: interleucina (IL) -1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (SCHWARTZ *et al.*, 1997). Algumas observações sugerem, ainda, que as proteases (ou proteinases) bacterianas podem interagir diretamente com os receptores de superfície das células do hospedeiro, modulando a resposta inata (TRAVIS e POTEPA, 2000).

É sabido que a complexa interação entre a microbiota da cavidade bucal e o hospedeiro é um importante ponto para o entendimento das associações causais entre determinadas condições sistêmicas e susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças periodontais. Estes fatores e condições podem interferir e modular a relação entre o desafio microbiano e a resposta do hospedeiro. Classicamente, diabetes, fumo, imunossupressão, alterações hormonais, *estresse*, uso de medicações e alcoolismo são reconhecidos como variáveis que podem alterar a patogênese, a expressão e o manejo clínico das doenças periodontais (ALBANDAR e RAMS, 2002; COSTA *et al.*, 2009).

Dentre todos estes fatores, de particular interesse nesta pesquisa, está o uso e dependência ao álcool. A ingestão de bebidas alcoólicas e as desordens físico-psicológicas dela decorrentes são mundialmente reconhecidas como problemas de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992) classifica o consumo de álcool em: consumo de risco, consumo nocivo e dependência. Enquanto a primeira classe gera danos físicos ou mentais apenas mediante hábito persistente, a segunda necessariamente implica danos à saúde. Finalmente, por dependência entende-se o padrão de consumo com no mínimo três aspectos clínicos e comportamentais característicos como o descontrole sobre o uso de álcool, o aumento da tolerância ao álcool e sintomas de privação quando o consumo é descontinuado.

A ação do álcool como fator de risco tem sido investigado em relação a uma grande variedade de condições uma vez que seu consumo é responsável por cerca de 4% de todas as mortes no mundo e por 5% do contingente global de doenças. Além disso, é uma causa importante de desigualdades na saúde das pessoas com impacto social negativo devido ao alto custo e demanda de cuidados específicos (BEAGLEHOLE E BONITA, 2009). Assim, é notório que o etilismo favorece a um estilo de vida que pode trazer graves problemas para a saúde dos indivíduos. Na última década, vários estudos têm sugerido uma associação de risco entre consumo de bebidas alcoólicas e doença periodontal (NISHIDA *et al.*, 2004; OKOMOTO *et al.*, 2006; PITIPHAT *et al.*, 2003; SAKKI *et al.*, 1995; SHIMAZAKI *et al.*, 2005; TEZAL *et al.*, 2001; 2004).

Estima-se que 90% da população norte-americana tem o hábito de beber bebidas alcoólicas, 40 a 50% desses apresentam problemas temporários associados a esse hábito, 10% dos homens e 3 a 5% das mulheres são alcoólatras. O impacto econômico devido ao abuso de bebidas alcoólicas foi estimado em \$ 150 bilhões em 1995 (NOVACEK *et al.*, 1995).

No Brasil, foram identificadas menos de duas dezenas de trabalhos epidemiológicos de prevalência do alcoolismo que, utilizando metodologias diversas, descreveram prevalências que variaram de 3,4% a 22,6%. Dentre esses o estudo epidemiológico mais abrangente do uso de álcool na população brasileira foi o realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) (GALDURÓZ e CAETANO, 2004). Este estudo domiciliar englobou 107 cidades com mais de 200 mil habitantes – correspondendo a 47.045.907 habitantes, ou seja, 27,7% do total do Brasil. A amostra totalizou 8.589 entrevistados. O uso de álcool pela população total foi de 68,7%. Essa proporção se manteve mais ou menos

estável para as diferentes faixas etárias, lembrando que, entre 12 e 17 anos, 48,3% dos entrevistados relataram usar bebidas alcoólicas. A prevalência da dependência de álcool foi de 11,2%, sendo de 17,1% para o gênero masculino e 5,7% para o feminino. A prevalência de dependentes foi maior nas regiões Norte e Nordeste, com porcentagens acima dos 16%. O fato mais preocupante foi a constatação de que, no Brasil, 5,2% dos adolescentes (12 a 17 anos de idade) eram dependentes do álcool. No Norte e Nordeste, essa porcentagem ficou próxima dos 9% sugerindo que a condição socioeconômica pode ser considerada como uma associação de risco para o alcoolismo. Outras informações advindas desse levantamento domiciliar foram: o uso de uma ou duas doses de bebidas alcoólicas por semana foi considerado um risco grave para a saúde por 26,7% dos respondentes. A porcentagem de pessoas que já receberam tratamentos para o uso de álcool chegou aos 4% do total, sendo 5,6% para o gênero masculino e 2,5% para o feminino. A faixa etária em que apareceram as maiores porcentagens foi aquela com indivíduos de mais de 18 anos de idade. Quanto às complicações decorrentes do uso de álcool, apareceram em maior porcentagem as discussões após beber, com 5% do total, sendo que, 7,9% dos homens e 2,1% das mulheres já discutiram sob o efeito do álcool. As quedas como consequência do uso de álcool foram a segunda colocada (3,3%) e as outras complicações estiveram em torno dos 2%.

A existência de uma plausibilidade biológica que explica o efeito do álcool nos tecidos periodontais tem sido indicada em estudos da última década (Tezal et al 2001, Pitiphat et al 2003). O álcool afeta a resposta do hospedeiro; prejudica neutrófilos, macrófagos, as funções das células T, e aumenta a frequência de infecções. Além disso, tem efeitos tóxicos sobre o fígado interferindo com o metabolismo de proteínas. Estudo in vitro (Tezal et al. 2001) mostrou que o etanol

estimula a reabsorção óssea, suprime o turnover ósseo, e pode ter um efeito tóxico direto sobre os tecidos periodontais. Consumo constante e excessivo de álcool podem afetar a resposta do hospedeiro a infecções causadas por bactérias (Amaral et al. 2008).

Segundo Tezal *et al.* (2001), o consumo de bebidas alcoólicas está associado à gravidade da doença periodontal, independente do nível de higiene bucal, ao contrário de outros estudos que sugerem que a gravidade da doença periodontal está correlacionada ao fator de risco comportamental, pois um pobre nível de higiene bucal é um fator característico nos indivíduos usuários de bebidas alcólicas (NOVACEK *et al.*, 1995; ENBERG *et al.*, 2001).

Em adição, o hábito de consumir bebidas alcoólicas ainda foi associado ao aumento de atividade de alguns patógenos periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*). O estudo realizado por Tezal *et al.* (2001) por meio de análise bivariável mostrou maior nível de *Porphyromonas gingivalis* e *Bacterioides foythus* em indivíduos com hábito de beber mais de 10 doses de bebida alcoólica por semana.

Tradicionalmente, o consumo de álcool é associado a danos irreversíveis que muitas vezes levam ao óbito. Esse fato por ter contribuído para que doenças com menor morbidade tenham recebido também uma menor atenção. Por isso devemos lembrar que por longos anos a doença periodontal, assim como outras doenças bucais, foi considerada como pouco relevante dentro dos sistemas de saúde. Todavia, à luz do conhecimento atual alguns aspectos devem ser considerados como a extensão na qual a doença periodontal afeta as populações, o impacto que a saúde bucal tem sobre aspectos como a qualidade de vida e o desempenho diário

das pessoas, além das crescentes evidências sobre a inter-relação entre o status periodontal e a condição sistêmica do indivíduo.

Embora pouco investigado e com dados conflitantes o alcoolismo é reconhecido como um fator comportamental associado às doenças periodontais (JANSSON, 2008; SHIMAZAKI *et al.*, 2005; TEZAL *et al.*, 2001). Adicionalmente, pouco se conhece sobre a sua interferência na resposta microbiana e imunológica frente à periodontite. Assim, este estudo objetiva maiores esclarecimentos da influência do consumo de álcool na gravidade e susceptibilidade às doenças periodontais, bem como a influência de variáveis de risco epidemiológicas, microbiológicas e imunológicas envolvidas nesta associação.

Neste sentido, esta tese será apresentada no formato de dois artigos científicos intitulados: Estudo I - Variáveis de risco na associação entre consumo e frequência de álcool com Periodontite e Estudo II - Quantificação de periodontopatógenos e citocinas pró-Inflamatórias em indivíduos com periodontite dependentes e não usuários de álcool.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as condições periodontais, perfil microbiológico e imunológico entre indivíduos com diferentes níveis de consumo de bebidas alcoólicas.

2.2 Objetivos específicos

a) investigar a associação entre a prevalência de periodontite e gravidade do uso do álcool, e adicionalmente, verificar a influência de variáveis de risco biológicas, comportamentais e sociais nesta associação.

b) avaliar em indivíduos com periodontite a provável influência do uso e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas na quantificação subgengival de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum*, e quantificação de interleucina 1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) no fluido gengival.

3 JUSTIFICATIVA

O consumo de álcool contribui fortemente na etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde. Tradicionalmente, é associado a danos irreversíveis que muitas vezes levam ao óbito. Esse fato por ter contribuído para que doenças com menor morbidade tenham recebido também uma menor atenção. Por isso devemos lembrar que por longos anos a doença periodontal, assim como outras doenças bucais, foi considerada como pouco relevante dentro dos sistemas de saúde. Todavia, à luz do conhecimento atual alguns aspectos devem ser considerados como a extensão na qual a doença periodontal afeta as populações, o impacto que a saúde bucal tem sobre aspectos como a qualidade de vida e o desempenho diário das pessoas, além das crescentes evidências sobre a inter-relação entre o status periodontal e a condição sistêmica do indivíduo.

Assim, o presente estudo tem especial interesse em buscar evidências da associação de risco entre alcoolismo e periodontite e adicionalmente, verificar a influência deste fator comportamental na resposta microbiológica e imunológica frente à periodontite.

4 HIPÓTESES

Indivíduos dependentes ou usuários intensos de bebida alcoólica apresentam maior prevalência e gravidade de periodontite em relação a indivíduos não usuários ou usuários ocasionais de álcool.

Indivíduos com periodontite dependentes e usuários intensos de bebida alcoólica apresentam maior frequência dos periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Eikenella corrodens* em relação a indivíduos com periodontite não usuários ou usuários ocasionais de álcool.

O consumo e a dependência de álcool estão associados à maior quantificação de mediadores TNF- α e IL-1 β em indivíduos com periodontite.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO I

VARIÁVEIS DE RISCO NA ASSOCIAÇÃO ENTRE CONSUMO E DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL COM PERIODONTITE *

ARTIGO II

QUANTIFICAÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE DEPENDENTES E NÃO USUÁRIOS DE ÁLCOOL

* Artigo aceito para publicação no Journal of Clinical Periodontology

ARTIGO I

VARIÁVEIS DE RISCO NA ASSOCIAÇÃO ENTRE CONSUMO E FREQUÊNCIA DE ÁLCOOL COM PERIODONTITE

Título corrido:

Associação entre periodontite e consumo de álcool.

Palavras: 3949

04 tabelas

01 Figura

Resumo

Objetivo: investigar a associação entre frequência e gravidade do uso do álcool e periodontite. Em adição, verificar a influência de variáveis de risco biológicas, comportamentais e sociais nesta associação.

Metodologia: A amostra foi constituída por 542 indivíduos de ambos os gêneros, idade entre 35 e 55 anos submetidos a exame periodontal completo. Foram formados 4 grupos de acordo com uso e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas: Grupo não usuários ou uso ocasional (GN), uso moderado (GM), uso intenso (GI) e dependentes alcoólicos (GD) de acordo com os instrumentos AUDIT e CAGE. Associação entre ocorrência de periodontite e variáveis de risco foi verificada por análise univariada e multivariada de regressão logística estratificada pelo hábito de fumar.

Resultados: A prevalência de periodontite nos grupos GN, GM, GI e GD foi de respectivamente, 17.2%, 24.0%, 29,6% e 53%. As taxas de razão de chance (RC) para ocorrência de periodontite aumentaram significativamente com o aumento da exposição ao álcool (GD>GI>GM>GN). Em todos os grupos usuários de álcool as estimativas de RC foi aproximadamente duas vezes maior em fumantes (RC=3.43 a 7.91) quando comparados a não fumantes (RC=1.22 a 3.02). Adicionalmente, perda dentária foi associada a periodontite nos grupos GM,GI e GD.

Conclusão: a prevalência de periodontite em usuários de álcool foi alta e, de forma incremental, frequência e dependência ao álcool aumentaram a chance de ocorrência de periodontite, principalmente em fumantes.

Palavras-chave: álcool, periodontite, fatores de risco, prevalência.

Relevância Clínica

Racionalização: Dados sobre a associação entre consumo de álcool e periodontite são controversos. Em adição, poucos estudos relatam esta associação incluindo indivíduos com dependência alcoólica.

Principais achados: A prevalência de periodontite em usuários de álcool foi alta, variando de 24% a 53%. Variáveis de risco como tabagismo, número de dentes perdidos foram significativamente associadas à ocorrência de periodontite.

Implicações práticas: Uma maior frequência do consumo de álcool aumentou a ocorrência de periodontite, sendo este efeito ainda maior em fumantes. Assim, campanhas e estratégias educativas e preventivas no âmbito da saúde geral devem atentar para os efeitos maléficos do álcool principalmente associado ao fumo.

Introdução

É sabido que a complexa interação entre a microbiota da cavidade bucal e o hospedeiro é um importante ponto para o entendimento das associações causais entre determinadas condições sistêmicas e susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças periodontais. Estes fatores e condições podem interferir e modular a relação entre o desafio microbiano e a resposta do hospedeiro. Classicamente, diabetes, fumo, imunossupressão, alterações hormonais, stress, uso de medicações e alcoolismo, são reconhecidos como fatores que podem alterar a patogênese, a expressão e o manejo clínico das doenças periodontais (Albandar et al. 2002, Costa et al. 2009, Sarfati et al. 2010).

Segundo Tezal et al. (2001), o consumo de bebidas alcoólicas está associado à gravidade da doença periodontal (DP), independente do nível de higiene bucal, ao contrário de outros estudos que sugerem que a gravidade da doença periodontal está correlacionada ao fator de risco comportamental, entretanto pobre nível de higiene bucal é um fator característico nos indivíduos usuários de bebidas alcoólicas (Novacek et al. 1995, Amaral et al. 2009).

O uso abusivo de álcool é um grave problema mundial que favorece a um estilo de vida que pode trazer problemas sociais, econômicos e para a saúde dos indivíduos (Casswell, 2011). Um estudo no Brasil com uma amostra de 8.589 indivíduos revelou que 68,7% faziam uso de álcool e 11,2% são dependentes alcoólicos (Amaral et al. 2008). Uma baixa condição socioeconômica foi considerada como uma associação de risco para o alcoolismo (Galduróz e Caetano, 2004).

Na última década, estudos com resultados conflitantes têm sugerido uma associação de risco entre bebidas alcoólicas e doença periodontal (Sakki et al. 1995; Nishida et

al. 2004; Okomoto et al. 2006; Pitiphat et al. 2003; Shimazaki et al. 2005; Tezal et al. 2001e 2004, Amaral et al. 2009; Sarfati et al. 2010).

Entretanto, estudos com maior rigor metodológico na associação entre álcool e doença periodontal devem ser conduzidos principalmente nas mensurações dos gradientes de exposição ao álcool e definição de periodontite. Em adição, poucos estudos foram reportados da associação entre periodontite e dependentes alcoólicos (Amaral et al. 2008). Assim, de acordo com os prévios estudos relatados, foi hipotetizado que um alto consumo de álcool está associado a uma pior condição periodontal.

O presente estudo objetivou investigar a associação entre a frequência e gravidade do uso do álcool e periodontite, e adicionalmente, verificar a influência de variáveis de risco biológicas, comportamentais e sociais nesta associação.

Metodologia

Amostra

Neste estudo transversal exames periodontais completos e entrevistas com coleta de variáveis de risco biológicas, sociais e comportamentais foram realizados em uma amostra de conveniência composta por 542 indivíduos no período compreendido entre Junho/ 2008 a Dezembro de 2010. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), protocolo número (0094.0.203.000-10) (anexo A).

Estes indivíduos foram selecionados de uma lista única de 1420 indivíduos aguardando por tratamento médico e odontológico em 03 postos de saúde da região oeste de Belo Horizonte, Brasil. Após leitura das fichas de identificação e exclusão dos indivíduos com idade <35 e > 55 anos, 1010 indivíduos foram considerados

elegíveis e foram convidados por chamadas telefônicas para participar da pesquisa. Assim, 197 indivíduos não foram encontrados e 813 indivíduos foram agendados para exame clínico e entrevistas. Destes, 173 não preencheram os critérios de inclusão/exclusão, 79 não compareceram aos exames agendados, 6 recusaram o exame periodontal alegando desconforto e 13 não aceitaram responder os questionários específicos sobre o uso de álcool. Um fluxograma da estratégia amostral é mostrado na figura 01. Assim a amostra final foi constituída por 542 indivíduos de ambos os gêneros, idade entre 35 e 55 anos ($47,3 \pm 5.7$), nível sócio-econômico e educacional heterogêneo. Decidiu-se concentrar em um grupo etário principal, 35-55 anos de idade, para reduzir a variação resultante de uma faixa etária ampla.

Para determinar a frequência e intensidade do uso de álcool foram utilizados dois questionários: Teste de identificação de distúrbio de uso de álcool (AUDIT proposto por Saunders et al. 1993; anexo 1) composto por 10 questões, sendo que escores >8 identifica problemas com álcool (anexo B) e CAGE (*cut-down, annoyed, guilty, eye-opner*; anexo 2) composto por 4 questões, onde escores ≥ 2 identifica dependência alcoólica (Mayfield et al. 1974; Ewing 1984) (anexo C). Ambos os questionários foram validados para a população brasileira (Masur e Monteiro et al. 1983, Mendoza-Sassi & Béria, 2003). Assim, os indivíduos foram categorizados de acordo com o uso e frequência de ingestão de bebida alcoólica e escores dos questionários CAGE e AUDIT em 04 grupos:

(1) Grupo não usuários ou uso ocasional (GN) = frequência de uso nunca ou menor que mensalmente, no AUDIT e CAGE escore zero.

(2) Grupo de uso moderado (GM)= frequência de uso 2-4 vezes ao mês, AUDIT com escore ≤ 8 e CAGE escore zero.

(3) Grupo de uso intenso (GI)= frequência de uso 2-3 vezes por semana, AUDIT com escore ≥ 8 e CAGE ≤ 1 .

(4) dependentes alcoólicos (GD)= frequência de uso 4 ou mais vezes por semana, AUDIT com escore > 8 e CAGE escore ≥ 2 .

Após o consentimento formal, os indivíduos eram questionados sobre sua história médica, dados demográficos, questionário AUDIT e CAGE por um examinador e em seguida o exame clínico periodontal era realizado por outro examinador cego para as entrevistas. Adicionalmente, indivíduos com necessidade de tratamento periodontal foram diretamente encaminhados para as unidades públicas especializadas de atendimento odontológico. Indivíduos identificados nos grupos GI e GD foram orientados a procurar por tratamento específico para o alcoolismo na Unidade de atenção a drogas psicotrópicas do Hospital das Clínicas da UFMG e AAA (Associação dos Alcoólatras Anônimos em Belo Horizonte, Brazil).

Critérios de exclusão:

(a) mulheres grávidas; (b) apresentar doenças debilitantes que comprometam o sistema imunológico (por exemplo, SIDA, neoplasias e doenças auto-imunes); (c) ocorrência de crescimento gengival por drogas; (d) idade < 35 anos e $>$ que 55 anos; (f) uso de maconha, cocaína, crack ou outras drogas ilícitas; (g) uso de antibióticos em prazo inferior a 3 meses do exame; h) apresentar menos de 14 dentes na cavidade bucal.

Caracterização da amostra

Foram coletados dados referentes às seguintes características: gênero; idade (35-55 anos), renda familiar em salários mínimo brasileiro [(SM); < 5 ou ≥ 5], grau de instrução escolar (< 8 anos ou ≥ 8 anos), *status* co-habitacional (sozinho ou com companhia), índice de placa, visitas odontológica categorizada em: nos últimos 2

anos, 2-5 anos e > 5 anos), perda dental (média de dentes perdidos), tabagismo com um ponto de corte na categorização em indivíduos que relataram fumar menos (não-fumantes) ou mais (fumantes/ex-fumantes) de 100 cigarros durante toda a vida (Tomar & Asma, 2000), presença de diabetes (valores de glicemia >126 mg /dl ou tomando hipoglicemiantes por mais de duas semanas- American Diabetes Association, 2003) e índice de massa corporal (<25 e \geq 25 Kg/m²).

Exame Clínico Periodontal

Em todos os exames clínicos periodontais registrou-se para cada paciente os dados de índice de placa (Silness & Loe, 1964), profundidade de sondagem (PS) de forma circunferencial em todos os dentes presentes e registrados os maiores valores para quatro sítios de sondagem (vestibular, lingual, mesial e distal), nível clínico de inserção periodontal (NCI) registrando-se a maior medida das superfícies vestibular e lingual/ palatina e sangramento à sondagem (SS) avaliada no momento da medida da PS ou em até 30 a 60 segundos após e anotados para quatro sítios com valores dicotômicos (positivo ou negativo). Os exames foram realizados com boas condições de iluminação e bio-segurança nas clínicas dos postos de saúde.

O conjunto de instrumental padronizado para o exame incluiu: pinça clínica, espelho bucal, sonda periodontal milimetrada (modelo Carolina do Norte - PCPUNC15BR - Hu-Friedy®). Os exames e entrevistas foram realizados por dois examinadores treinados e especialistas em Periodontia (FOC e EJPL).

Definição de periodontite

Periodontite foi diagnosticada quando da presença de 4 ou mais dentes com 1 ou mais sítios com PS \geq 4mm e NCI \geq 3mm no mesmo sitio (López et al. 2002).

Reprodutibilidade

Medidas de PS, NCI foram realizadas e repetidas com um intervalo de uma semana em 12 indivíduos selecionados aleatoriamente do grupo amostral piloto (n=60). Os resultados mostraram valores de Kappa ponderado para concordância intra e inter-examinadores para as medidas de PS, NCI >0.89 e coeficiente de correlação intra-classe > 0,87 ($p < 0,001$). Um treinamento e calibração no estudo piloto também foi realizado para os questionários AUDIT e CAGE. Um coeficiente de concordância foi calculado para as respostas do questionário CAGE e AUDIT e revelaram concordância de 100% para a classificação dos indivíduos nos quatro grupos propostos.

Análise Estatística

A análise estatística incluiu uma caracterização descritiva da amostra de acordo com o status do consumo e frequência de álcool e das variáveis de interesse (tabelas de frequência, valores médios e porcentagens).

Análises univariada por meio do teste do qui-quadrado e ANOVA foram utilizados quando adequado. As variáveis clínicas, incluindo médias de SS, índice de placa, PS e NCI, bem como a porcentagem de sítios com PS e NCI ≥ 5 mm foram calculados para cada indivíduo e, em seguida, obtido a média entre os indivíduos para os 4 grupos. Para variáveis com variâncias iguais entre os grupos, a significância foi testada por meio de análise de ANOVA e *post hoc* a significância das múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. Para as variáveis com variâncias desiguais entre os grupos, a significância foi testada usando teste de Welch e *post hoc* a significância das múltiplas comparações pelo teste de Tamhane. Análise univariada para a distribuição de variáveis independentes (uso do álcool e variáveis explanatórias) pela ocorrência de periodontite foi realizada e taxas de razão de chance (RC) brutas reportadas. Em adição, o efeito de variáveis na

ocorrência de periodontite foi avaliada por regressão logística multivariada. Devido a um provável efeito de interação e para evitar o tratamento do tabagismo como fator de confundimento, três modelos distintos de regressão logística foram realizados estratificados pelo hábito de fumar (não fumantes, ex-fumantes e fumantes). As variáveis que apresentaram valores de $p < 0.25$ na análise univariada foram incluídas em um modelo de regressão logística multivariado de casos (1) ou não-casos (0) de periodontite e removidas manualmente (passo a passo), até o teste de razão log-likelihood indicar que nenhuma variável deveria ser removida. Gênero, idade, renda familiar, nível educacional e diabetes foram incluídas no modelo final devido a sua forte associação com periodontite. Todas variáveis incluídas no modelo final foram determinadas independentes por meio de avaliação de sua colineariedade. Interações de primeira ordem entre os grupos de exposição ao álcool e fumantes foram testadas em um modelo separado e mantidas quando significativas. Os coeficientes da regressão, seus intervalos de confiança (IC) em 95%, estimativas de RC e valores de p foram também determinados. Áreas sob a curva ROC (*receiver operating curves*), uma estimativa da eficácia dos modelos, foram reportadas.

Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0 for Windows - SPSS Inc., Chicago, IL) e considerados significantes com valores de $p < 0.05\%$.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a distribuição de variáveis de interesse nos quatro grupos estudados. Ressalta-se que a taxa de prevalência de usuários de álcool na amostra foi de 45,2% (n=245). Mulheres foram significativamente mais predominantes do que homens ($p < 0.001$), entretanto reportou-se pouca frequência de mulheres nos grupos

GM, GI e GD. Indivíduos com renda familiar < 5 SM, sem companheiros, < 8 anos de escolaridade foram mais freqüentes nos grupos GM, GI e GD, entretanto esta diferença não foi significativa. Fumantes foram significativamente mais frequentes nos grupos GD e GI que nos demais grupos.

A média de tempo em anos do uso de álcool nos grupos foi crescente, isto é, GM < GI < GD é de respectivamente 26.3 (± 9.7); 27.3 (± 10.4); 28.6 (± 9.7) (ANOVA- $p < 0.005$).

Variáveis periodontais foram avaliadas nos diferentes grupos com relação ao consumo do álcool (tabela 2). Indivíduos dos grupos GM, GI, GD apresentaram maior valores em porcentagem no índice de placa e média de sítios com SS, média e porcentagem de sítios com PS ≥ 5 mm e NCI ≥ 5 mm que indivíduos do grupo GN. Estas diferenças foram estatisticamente significantes entre todos os pares dos grupos que consumiram álcool, incluindo GD versus GI, GD versus GM, GD versus GN, GI versus GM, GI versus GN e GM versus GN.

Todos os indivíduos avaliados apresentaram uma média alta de dentes remanescentes (23.8 ± 2.3). Foi examinado um total de 51.598 sítios, com uma média de 95.2 sítios por indivíduo. Na tabela 2 observa-se que as diferenças entre todos os pares dos grupos GD e GI na média de dentes perdidos foram significativamente maior que as reportadas para GM e GN.

A tabela 3 mostra a distribuição de casos e não casos de periodontite com relação ao status de exposição ao álcool e variáveis de risco biológicas, sociais e comportamentais. Um total de 134 indivíduos foi incluído na definição de periodontite (casos). A prevalência de periodontite na amostra global foi de 24.7%, sendo nos grupos GN, GM, GI e GD de respectivamente 17.2% (referência), 24.0% (RC=1.52, IC: 1.07-2.65), 29,6% (RC=2.03, IC: 1.15-3.57) e 53% (RC=4.72, IC:2.73-7.92).

Assim, a prevalência de periodontite aumentou significativamente com o aumento da exposição ao álcool (GD>GI>GM; $p < 0,05$). Na análise univariada, indivíduos com renda < 5 SM, fumantes e ex-fumantes foram significativamente associados com ocorrência de periodontite (Tabela 3, Teste Qui-quadrado; $p < 0,001$)

Variáveis significativas e respectivas estimativas de RC ajustadas associadas à ocorrência de periodontite nos modelos finais de regressão logística, estratificados pelo hábito de fumar, foram: (1) Fumantes: uso do álcool (grupo GM: RC=3.43, IC 1.04-3.98; grupo GI: RC 5.48, IC 1.97-6.02; grupo GD RC= 7.91, IC 2.96-12.18) e perda dentária (RC=2.82, IC= 1.07-5.78); (2) Ex-Fumantes: uso do álcool (grupo GM: RC=2.82, IC 1.21-2.72; grupo GI: RC 3.75, IC 1.21-4.13; grupo GD: RC= 4.12, IC 1.63-5.91) e perda dentária (RC=2.73, IC= 1.02-3.82); (3) Não Fumantes: uso do álcool (grupo GM: RC=1.22, IC 1.02-1.63; grupo GI: RC= 2.17, IC 1.03-2.21; grupo GD RC= 3.02, CI 1.51-5.96) e perda dentária (RC=1.14, CI= 1.01-1.98). Assim, ressalta-se um forte efeito de interação uso do álcool-fumo, sendo as RC para ocorrência de periodontite nos grupos de usuários de álcool fumantes aproximadamente duas vezes maior que as reportadas para não fumantes (Tabela 4).

Gênero, idade, índice de placa, renda familiar < 5 SM, IMC, escolaridade, *status* co-habitacional, visitas dentais e diabetes não foram variáveis significativas para prever casos de periodontite nos modelos finais de regressão logística estratificados pelo hábito de fumar (tabela 4).

DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos do consumo e dependência ao álcool na doença periodontal, e confirmou a hipótese de que um maior consumo de álcool foi

associado à prevalência e gravidade da periodontite, sendo estes achados fortemente ocorrentes em fumantes. Diversos estudos com resultados conflitantes foram reportados sobre a associação entre álcool e doença periodontal, sendo encontrado associação positiva (Novacek et al. 1995, Enberg et al. 2001, Khocht et al. 2003, Amaral et al. 2008 e 2009, Konstad et al. 2008) e em outros estudos ausência de associação (Torrunguang et al. 2005, Bouchard et al. 2006, Jansson 2008). Até o presente momento poucos estudos investigaram a associação entre dependência de álcool e doença periodontal (Novacek et al. 1995, Enberg et al. 2001, Khocht et al. 2003, Amaral et al. 2008).

A existência de uma plausibilidade biológica que explica o efeito do álcool nos tecidos periodontais tem sido indicada em estudos recentes (Tezal et al 2001, Pitiphat et al 2003). O álcool afeta a resposta do hospedeiro; prejudica neutrófilos, macrófagos, as funções das células T, e aumenta a frequência de infecções. Além disso, tem efeitos tóxicos sobre o fígado interferindo com o metabolismo de proteínas. Estudo in vitro (Tezal et al. 2001) mostrou que o etanol estimula a reabsorção óssea, suprime o turnover ósseo, e pode ter um efeito tóxico direto sobre os tecidos periodontais. Consumo constante e excessivo de álcool podem afetar a resposta do hospedeiro a infecções causadas por bactérias (Amaral et al. 2008).

As taxas de prevalência de periodontite em usuários de álcool reportadas neste estudo foram altas, bem como taxas de razão de chance significativas para a ocorrência de periodontite. Achados similares (Sakki et al. 1995, Tezal et al. 2001, Tezal et al. 2004, Amaral et al. 2008) e controversos (Shimazaki et al. 2005, Bouchard et al. 2006, Jansson 2008) foram reportados. Neste estudo, estes achados reforçaram o efeito dose-exposição do álcool na ocorrência de periodontite.

Deve ser ressaltado, que questões metodológicas podem ter influenciado de maneira significativa os achados conflitantes entre uso de álcool e periodontite. Alguns destes estudos foram conduzidos em amostras pequenas e com grande variabilidade metodológica para a definição de dose-exposição, considerando diferentes pontos de corte para quantidade, frequência e tipos bebidas (Torrunguang et al. 2005; Bouchard et al. 2006; Jansson, 2008) e outros com definições menos robustas para periodontite (Shizukuishi et al. 1998; Okomoto et al. 2006).

Métodos de mensuração do grau de exposição e dependência ao álcool são complexos e sujeitos a vieses de informação, entretanto a utilização dos questionários AUDIT e CAGE pode minimizar esses vieses. O AUDIT foi desenvolvido sob patrocínio da OMS é dotado de 10 perguntas, 3 sobre consumo de bebidas alcoólicas, 4 sobre dependência de bebidas alcólicas e 3 sobre problemas com bebidas alcoólicas (Saunders et al.1993). O GAGE foi validado no Brasil, sendo composto por quatro perguntas e, quando adotado o ponto de corte de 2 respostas positivas, a sua especificidade é de 83% e a sua sensibilidade de 88% para a identificação de indivíduos dependentes de bebidas alcoólicas (Masur & Monteiro,1983, Amaral et al. 2008).

O presente estudo incluiu um grande número de participantes, todos na faixa etária de 35-55 anos. Alguns estudos têm apontado a idade como indicador de risco associado à periodontite (Amaral et al. 2008; Do et al. 2003). Assim, a estratégia deste estudo em restringir a idade entre 35 e 55 anos, reduz a variância das mensurações e minimiza o impacto de confundimento deste indicador nas associações com outras variáveis de interesse. Adicionalmente, a idade neste estudo não foi associada à periodontite no modelo de regressão logística.

Neste estudo, a definição de caso (periodontite) escolhida pode ser considerada

robusta. Esta escolha foi utilizada para evitar a subestimação das taxas de periodontite e têm sido recomendada em estudos de associação (López et al. 2002). Entretanto, além da maior prevalência de periodontite reportada nos grupos usuários de álcool, piores condições nos parâmetros periodontais SS, PS e CAL também foram observados nestes grupos. Estes achados também foram reportados por estudos prévios (Tezal et al. 2001; Tezal et al. 2004; Amaral et al. 2008 e 2009; Kongstad et al. 2008).

Nosso estudo reportou um alto índice de placa em toda a amostra, variando de (~50% a 65%). Entretanto, o biofilme dental, considerado fator etiológico primário para doença periodontal (Davenport et al. 1998; Albandar & Rams, 2002, Costa et al. 2009) não foi significativa no modelo de regressão logística para ocorrência de periodontite. Assim, racionaliza-se que o biofilme dental é um fator necessário para desenvolvimento das doenças periodontais, mas a variação no acúmulo de placa tem um papel menor na variação da patogênese da periodontite (Grossi et al. 1994). Achados similares, quando o índice de placa bacteriana dental foi controlado foram reportados em outros estudos sobre associação álcool e doença periodontal (Novacek et al. 1995, Tezal et al. 2001, Amaral et al. 2008)

A periodontite tem sido apontada como uma das principais causas de mortalidade dental após 45 anos de idade (Costa et al. 2009) e tem sido relacionada a fortes impactos negativos na qualidade de vida de indivíduos periodontalmente susceptíveis. Assim, o número de dentes perdidos é considerado um forte indicador de risco à periodontite ou experiência pretérita de doença periodontal (Copeland et al. 2004, Costa et al. 2011). Em nosso estudo, a média de dentes perdidos foi baixa, entretanto, deve ser ressaltado que o critério de inclusão de no mínimo 14 dentes presentes pode ter tido um impacto nestes resultados. Em adição, este indicador foi

significativamente associado à ocorrência de periodontite em todos os grupos usuários de álcool e fortemente em fumantes (RC=2.82; IC:1.07-5.78).

A taxa de usuários de álcool foi uniformemente elevada em indivíduos do gênero masculino, e o oposto foi observado no gênero feminino. No Brasil, devido a questões sociais e comportamentais, estudos relatam menor uso de álcool por parte de mulheres (Galduroz & Caetano, 2004; Amaral et al. 2008). Entretanto, recentemente em indivíduos mais jovens, tem sido relatado um incremento no hábito de consumir bebida alcoólica por mulheres (Galduroz & Caetano, 2004). O fato do gênero, neste estudo não ser significativo no modelo de regressão, ressalta a força da associação álcool-periodontite, quando outros fatores explicativos e de confusão são controlados. Estes achados também foram reportados por Do et al. 2003, em estudos da associação entre tabagismo e periodontite em uma amostra representativa da população vietnamita.

Um grande número de estudos tem demonstrado que o tabagismo está fortemente associado ao risco de perda de inserção periodontal, perda óssea e perda dentária (Labriola et al. 2005; Heasman et al. 2006). Em adição, estudos mostraram valores incrementais de razão chance para a ocorrência de periodontite quando avaliado dose-exposição ao fumo (Grossi et al. 1994; Tomar e Asma, 2000; Torrungrung et al. 2005). Estudos também têm relatado alta prevalência de tabagismo em indivíduos usuários de álcool (Tezal et al. 2001; Tezal et al. 2004; Amaral et al. 2008; Kongstad et al. 2008). Nossos resultados confirmaram estes achados com uma alta taxa prevalência de tabagismo em usuários de álcool e o fumo foi fortemente associado à ocorrência de periodontite (RC de 3.43 a 7.91). Nossos achados também demonstraram que a associação entre uso e dependência de álcool não foi dependente do tabagismo (RC em não fumantes variou de 1.22 a 3.02). Achados

similares foram reportados por estudos prévios (Copeland et al. 2004; Tezal et al. 2001, 2004; Torrungruang et al. 2005; Amaral et al. 2008; Shizukuishi et al. 2008). Entretanto, o efeito da interação tabagismo e álcool, reportaram as maiores taxas de razão de chance para ocorrência de periodontite, principalmente em fumantes correntes do grupo GD, realçando o tabagismo como forte fator de risco à doenças periodontais.

Assim, os resultados da interação fumo-álcool podem ser explicados pelo potencial efeito de duas variáveis de risco que influenciam fortemente a susceptibilidade do hospedeiro. Em adição, este efeito também enfatiza a influência de variáveis comportamentais na etiopatogenia das periodontites. Por outro lado, o estudo transversal de Tezal et al. (2001), reportou ausência de interação entre fumo e álcool, entretanto estes autores ressaltam a importância de investigar interação em estudos que envolvem tal associação.

Estudos de associação de periodontite com outros indicadores de risco, como diabetes, IMC, renda familiar, escolaridade, condições de vida, visitas para cuidados odontológicos, renda familiar e escolaridade tem sido reportados na literatura com achados controversos (Albandar & Rans, 2002; Bouchard et al. 2006; Naoki et al. 2008, Costa et al. 2011). Em nosso estudo estes indicadores não foram significativamente associados à ocorrência de periodontite nos modelos finais de regressão logística. Apesar dos achados na literatura serem conflitantes, condições sócio-econômicas e culturais podem ter um efeito maior no comportamento dos indivíduos e facilitar a instalação de hábitos comportamentais nocivos à saúde (Coulson et al. 2010, Casswell, 2011).

Algumas limitações devem ser atribuídas ao nosso estudo, apesar da amostra expressiva, a mesma não pode ser considerada representativa para população

brasileira e o desenho transversal não permite detectar uma influência temporal entre o uso abusivo de álcool e periodontite. Assim estudos com amostras representativas e delineamentos longitudinais são requeridos.

Assim, conclui-se que a prevalência de periodontite em usuários de álcool neste estudo foi alta e, de forma incremental, frequência e dependência ao álcool aumentaram a chance de ocorrência de periodontite, principalmente em fumantes. Adicionalmente, perda dental foi associada a ocorrência de periodontite em todos os grupos estudados.

Campanhas e estratégias educativas e preventivas no âmbito da saúde geral devem atentar também para os efeitos maléficos do álcool na condição periodontal.

CONFLITO DE INTERESSES E FONTES DA PESQUISA

Os autores declaram não existir conflitos de interesse. Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e tecnologia (CNPq/Brasil – 474235/2010-6) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/ APQ-00207-11).

REFERÊNCIAS

1. Albandar, J.M. & Rams, T.E. (2002) Global epidemiology of periodontal disease: an overview. *Periodontology 2000* **29**, 7-10.
2. Albandar, J.M. (2002) Periodontal diseases in North America. *Periodontology 2000* **29**, 31-69.
3. Amaral, C.S., Luiz, R.R & Leão, A. (2008) The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *Journal of Periodontology* **79**, 993-998.
4. Amaral, C.S., Vettore, M.V. & Leão, A. (2009) The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dentistry* **37**, 643-651.
5. American Diabetes Association (2005) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. *Diabetes Care* 2005;1(suppl.1):37-42.
6. Bouchard, P., Boutouyrie, P., Mattout, C., Bourgeois D. (2006) Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of Periodontology* **77**,479–89.
7. Casswell S. (2011). Health and societal effects of alcohol. *Lancet* **5**;377(9764):463-464.
8. Coulson, C.E., Williams, L.J., Henry, M.J., Berk, M., Lubman, D.I., Brennan, S.L., Nicholson, G.C., Kotowicz, M.A., Korn, S. & Pasco, J.A. (2010) Patterns of alcohol use and associated physical and lifestyle characteristics according to new Australian guidelines. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* **44**,946-951.
9. Copeland, L. B., Krall, E. A., Brown, L. J., Garcia, R. I. & Streckfus, C. F. (2004). Predictors of tooth loss in two US adult populations. *Journal of Public Health Dentistry* **64**, 31–37.
10. Costa, F.O., Guimarães, A.N., Cota, L.O. M., Pataro, A.L., Takeshi, K.S., Cortelli, S.C. & COSTA, J. E. (2009) Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *Journal of Oral Science* **51**, 199-206.
11. Costa, F. O., Miranda Cota, L. O., Pereira Lages, E. J., Medeiros Lorentz, T. C., Soares Dutra Oliveira, A. M., Dutra Oliveira, P. A. & Costa, J. E. (2011)

- Progression of periodontitis in a sample of regular and irregular compliers under maintenance therapy: A 3-year follow-up study. *Journal of Periodontology*. [Epub ahead of print]
12. Davenport, E.S., Williams, C.E., Sterne, J.A., Sivapathasundram, V., Fearn, J.M. & Curtis, M.A. (1998) The east London study of maternal chronic periodontal disease and preterm low birth weight infants: study design and prevalence data. *Annals of Periodontology* **3**, 213-221.
 13. Do, G.L., Spencer, A.J., Roberts-Thomson, K., Ha, H.D. (2003) Smoking as a risk indicator for periodontal disease in the middle-aged Vietnamese population. *Community Dentistry of Oral epidemiology* **31**, 437-446.
 14. Enberg, N., Wolf, J., Ainamo A., Alho, H., Heinälä, P. & Lenander-Lumikari, M. (2001) Dental diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: A radiological study. *Acta odontologica Scandinavica* **59**, 341-347.
 15. Ewing, J.A. (1984) 'Detecting Alcoholism: The CAGE Questionnaire', *Journal of the American Medical Association* **252**: 1905-1907.
 16. Grossi, S.G., Zambon, J.J., Ho, A.W., Koch, G., Dunford, R.G., Machtei, E.E., Norderyd, O.M. & Genco, R.J. (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* **65**, 260-267.
 17. Harris, C.K., Warnakulasuriya, K.A., Johnson, N.W., Gelbier, S. & Peters, T.J. (1996) Oral health in alcohol misusers. *Community Dental Health* **13**, 199-203.
 18. Heasman, L., Stacey, F., Preshaw, P.M., McCracken, G.I., Hepburn, S. & Heasman, P.A. (2006) The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 241-253.
 19. Jansson, L. (2008) Association between alcohol consumptions and dental health. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 379-384.
 20. Khocht, A., Janal, M., Schleifer, S. & Keller, S. (2003) The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. *Journal of Periodontology* **74**, 485-493.

21. Kongstad, J., Hvidtfeldt, U.A., Gronbaek, M., Stoltze, K. & Holmstrup, P. (2008) Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 1032-1039.
22. Labriola, A., Needleman, I. & Moles, D.R. (2005) Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000* **37**, 124-137.
23. Lopez, N. J., Smith, P. C. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **8**, 911-924.
24. Mayfield, D., McLeod, G., Hall, P. (1974) The CAGE questionnaire: Validation of a new alcoholism screening instrument. *American Journal of Psychiatry* **131**, 1121-1123.
25. Masur, J. & Monteiro, M.G. (1983) Validation of the "CAGE" alcoholism screening test in a Brazilian psychiatric inpatient hospital setting. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **16**, 215-218.
26. Mendoza-Sassi, R.A. & Béria, J.U. (2003) Prevalence of alcohol use disorders and associated factors: A population-based study using AUDIT in southern Brazil. *Addiction* **98**, 799-804.
27. Naoki, N., Morita, M., Kawanami, M. (2008) Oral health Care-specific self-efficacy assessment predicts patients' completion of periodontal treatment: a pilot study. *Journal of Periodontology* **79**:1041-1047.
28. Nishida, N., Tanaka, M., Hayashi, N., Nagata, H., Takeshita, T., Nakayama, K., Morimoto, K. & Shizukuishi, S. (2004) Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *Journal of Dental Research* **83**, 161-165.
29. Novacek, G., Plachetzky, U., Pötzi R, Lentner, S., Slavicek, R., Gangl, A. & Ferenci, P. (1995) Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis – Role of etiology of liver disease. *Journal of Hepatology* **22**, 576-582.
30. Okomoto, Y., Tsuboi, S., Suzuki, S., Nakagaki, H., Ogura, Y., Maeda, K. & Tokudome, S. (2006) Effects of smoking and drinking habits on the incidence

- of periodontal disease and tooth loss among Japanese males. *Journal of Periodontal Research* **41**, 560-566.
31. Pitiphat, W., Merchant, A.T., Rimm, E.B. & Joshipura, K.J. (2003) Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Dental Research* **82**, 509-513.
 32. Sakki, T.K., Kunuuttila, M.L., Vimpari, S.S. & Hartkainen, M.S. (1995) Association of lifestyle with periodontal health. *Community dentistry and oral epidemiology* **23**, 155-158.
 33. Sarfati, A., Bourgeois, D., Katsahian, A. S., Mora, F. & Bouchard, P. (2010) Risk assessment for buccal gingival recession defects in an adult population. *Journal of Periodontology* **81**, 1419-1425.
 34. Saunders, J.B., Aasland, O.G., Babor, T.F., de la Fuente, J.R. & Grant, M. (1993) Development of the alcohol use disorders identification test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption – II. *Addiction* **88**, 791-804.
 35. Shimazaki, Y., Saito, T., Kiyohara, Y., Kato, I., Kubo, M., Iida, M. & Yamashita, Y. (2005) Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama study. *Journal of Periodontology* **76**, 1534-1541.
 36. Silness, J. & Løe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.
 37. Shizukuishi, S., Hayashi, N., Tamagawa, H., Hanioka, T., Maruyama, S., Takeshita, T., Morimoto, K. (1998) Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. *Annals of Periodontology/the American Academy of Periodontology* **3**: 303–11.
 38. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2001) The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *Journal of Periodontology* **72**, 183-189.
 39. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2004) Alcohol consumption and periodontal disease. The third national health and nutrition examination survey. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 484-488.

40. Tomar, S.L. & Asma, S. (2000) Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Periodontology* **71**, 743-751.
41. Torrungruang, K., Tamsailom, S., Rojanasomsith, K., Sutdhibhisal, S., Nisapakulon, K., Vanichjakvong, O., Prapakamol S, Premsirinirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Unkurapinun N, Sritara P.(2005). Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. *Journal of Periodontology* **76**,558–65.

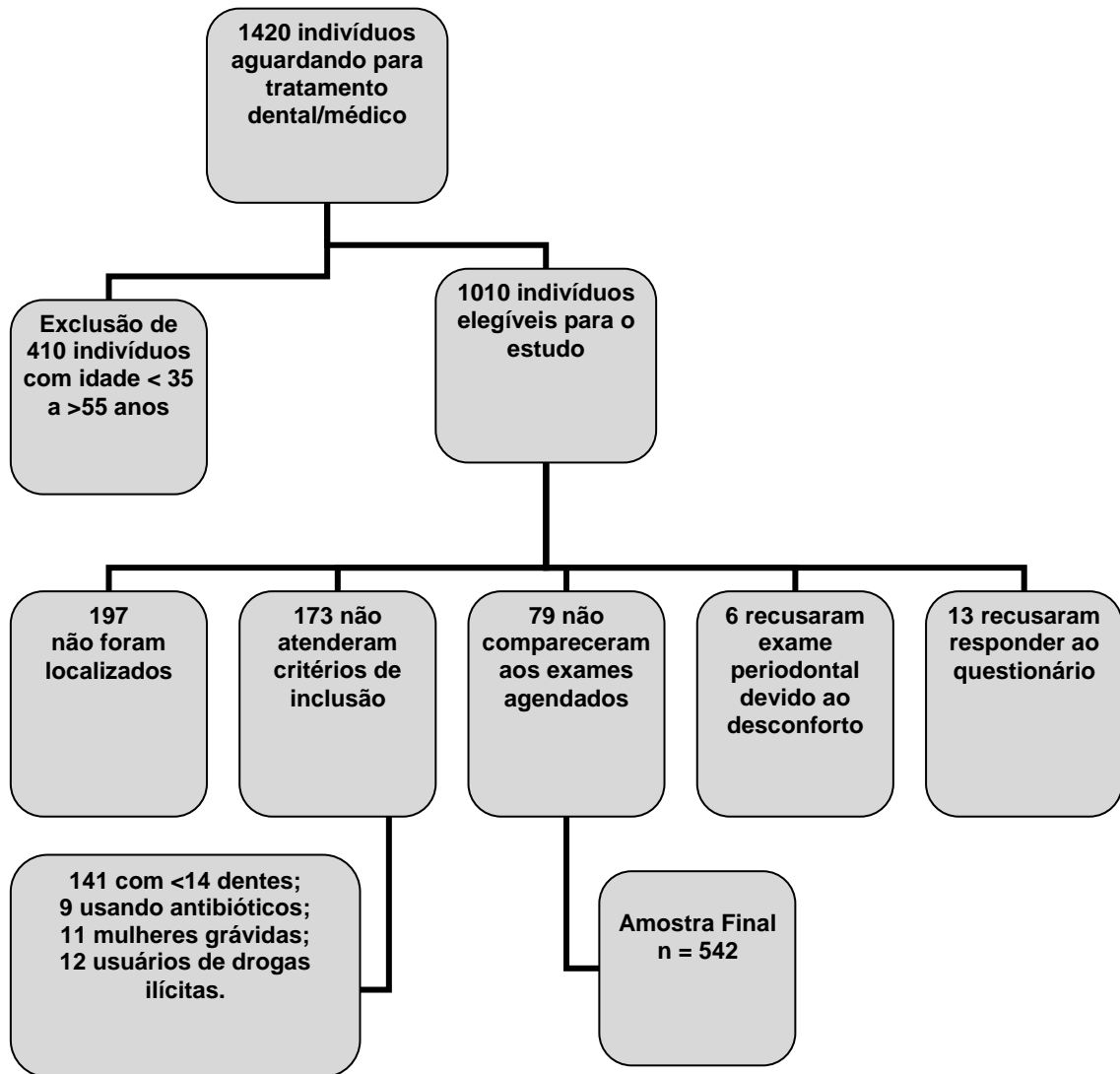


Figura 01- Fluxograma da estratégia amostral.

Tabela 1. Características dos grupos de acordo com o consumo de álcool.

Consumo de álcool	Não usuários ou ocasional (GN)	Uso Moderado (GM)	Uso Intenso (GI)	Álcool Dependência (GD)	Amostra total
Total	n = 297 (54.8%)	n = 96 (17.7%)	n = 81 (15%)	n = 68 (12.5%)	n = 542
Gênero*					
Mulheres	262 (90%)	19 (6.4%)	6 (2%)	5 (1.6%)	292
Homens	41 (16.5%)	50 (19.8%)	87 (34.9%)	72 (28.8%)	250
Idade					
≥ 35-45 anos	153 (61.3%)	28 (11.3%)	38 (15.2%)	31 (12.2%)	250
> 45-55 anos	155 (53.1%)	40 (13.8%)	48 (16.3%)	49 (16.8%)	292
Renda Familiar*					
< 5 SMB	141 (61.6%)	24 (10.3%)	36 (15.6%)	29 (12.5%)	230
≥ 5 SMB	132 (42.4%)	67 (21.3%)	88 (28.2%)	25 (8.1%)	312
Nível Educacional					
< 8 anos	120 (38.7%)	87 (28.1%)	64 (20.6%)	39 (12.6%)	310
≥ 8 anos	78 (33.5%)	74 (32.1%)	52 (22.4%)	28 (12.1%)	232
Status co-habitacional*					
Com companhia (família/amigos)	119 (32.0%)	105 (28.3%)	94 (25.2%)	54 (14.5%)	372
Sem companhia	52 (30.6%)	40 (23.4%)	35 (20.7%)	43 (25.3%)	170
Índice de massa corporal *					
≤25 Kg/m ²	103 (61.6%)	21 (12.7%)	25 (14.9%)	18 (10.8%)	167
> 25 Kg/m ²	211 (56.3%)	6 (16.4%)	58 (15.6%)	44 (11.7%)	375
Última Visita Dental					
Menos de 2 anos	102 (52.2%)	41 (21.2%)	30 (15.4%)	22 (11.2%)	195
2-5 anos	62 (54.4%)	19 (16.7%)	18 (16.1%)	15 (12.8%)	114
> 5 anos	117 (50.2%)	41 (17.8%)	43 (18.3%)	32 (13.7%)	233
Diabetes*					
Sim	15 (46.8%)	6 (18.8%)	6 (18.8%)	5 (15.6%)	32
Não	282 (55.3%)	90 (17.6%)	75 (14.7%)	63 (12.4%)	510
Tabagismo*					
Não Fumantes	112 (43.6%)	49 (18.8%)	74 (28.7%)	23 (8.9%)	258
Ex-fumantes	21 (17.0%)	25 (19.6%)	41 (32.8%)	38 (30.6%)	125
Fumantes	35 (21.9%)	19 (12.2%)	38 (23.6%)	67 (42.3%)	159
Tempo médio de uso de álcool (anos)[†]	NA	26.3 (±9.7)	27.3 (±10.4)	28.6 (±9.7)	28.3 (±10.5)

*Teste Qui-quadrado (p<0.001); [†]ANOVA (p<0.05); NA= não aplicável; SMB= salário mínimo Brasileiro (R\$545,00)

Tabela 2. Variáveis Periodontais de acordo com os grupos de consumo de álcool

Consumo de Álcool	Não Usuários ou Ocasional (GN)	Grupo Moderado (GM)	Grupo Intenso (GI)	Álcool Dependência (GD)
Índice de Placa (%) [*]	52.2 ±21.24	58.3 ±22.6	61.4 ±23.7	64.9 ±23.9
Média de SS [†]	10.3 ±13.2	12.3 ±8.9	12.9 ±11.3	14.2 ±13.8
Média de PS (mm) [†]	2.5 ±0.7	2.7 ±0.6	2.9 ±0.8	3.1 ± 0.9
Média de NCI(mm) [†]	2.9 ±0.5	3.1 ±1.3	3.3 ±1.7	3.8 ±1.2
Sítios com PS ≥ 5 mm (%) [†]	4.2 ±7.8	6.5 ±10.4	7.3 ±9.9	9.6 ±12.8
Sítios com NCI ≥ 5 mm (%) [†]	11.2 ±13.9	15.2 ± 19.7	19.3 ±21.2	25.8 ±24.7
Perda dental [†]	1.68± 2.81	1.75 ± 3.27	2.04 ± 3.30	2.53 ± 3.21

*Diferenças significativas entre os grupos $p < 0.05$, usando ANOVA e correção de Bonferroni).

† Diferenças significativas entre os grupos $p < 0.001$, usando teste de Welch e correção de Tamhane.

SS=sangramento à sondagem; PS= profundidade de sondagem; NCI=nível clínico de inserção.

Tabela 3. Análise Univariada de acordo com ocorrência de Periodontite

Variáveis	Periodontite Caso (n = 134)		Periodontite não caso (n = 408)		RC Bruta (95% IC)	P*
	N	%	n	%		
Grupos Uso de álcool						
Não usuários ou ocasional (GN)	51	17.2%	246	82.8%	-	-
Moderado (GM)	23	24.0%	73	76.0%	1.52 (1.07-2.65)	0.042
Intenso (GI)	24	29.6%	57	70.4%	2.03 (1.15-3.57)	0.012
Álcool dependência (GD)	36	53.0%	32	47.0%	4.72 (2.73-7.92)	<0.001
Gênero						
Homem	56	19.2%	236	80.8%	0.51 (0.38-0.77)	0.001
Mulher	78	31.2%	172	68.8%		
Idade						
≥ 35-45 anos	64	25.6%	186	74.4%	1.09 (0.88-1.93)	0.663
≥45-55 anos	70	24.0%	222	76.0%		
Renda Familiar						
<5 SMB	60	26.1%	170	73.9%	1.99 (1.29-3.05)	<0.001
≥5 SMB	47	15.1%	265	84.9%		
Nível educacional						
<8 anos	84	27.1%	226	72.9%	1.35 (0.96-2.12)	0.069
≥8 anos	50	21.6%	182	78.4%		
Status Co-habitacional						
Sem companhia	64	37.6%	106	62.4%	2.60 (0.73-3.9)	<0.001
Com companhia	70	18.8%	302	81.2%		
Índice de Massa Corporal						
≤ 25 Kg/m ²	55	33%	112	67.0%	0.54 (0.36-0.81)	0.002
>25 Kg/m ²	79	21.1%	296	78.9%		
Última visita Dental						
Últimos 2 anos	32	16.4%	163	83.6%	-	
2-5 anos	24	21.1%	90	78.9%	1.36 (0.75-2.44)	0.156
> 5 anos	78	33.5%	155	66.5%	1.34 (0.85-2.11)	0.101
Diabetes (Sim)	9	28.2%	23	71.8%	1.02 (0.54-2.67)	0.318
Tabagismo						
Não fumantes	21	12.9%	237	87.1%	-	-
Ex-fumantes	29	23.8%	96	74.2%	3.49 (1.85-6.27)	<0.001
Fumantes	56	35.2%	103	64.8%	6.15 (3.53-10.61)	<0.001

*Teste qui-quadrado.

Tabela 4. Modelos Finais de Regressão Logística para Periodontite de acordo com o hábito de fumar.

Variáveis	Fumantes (n =159)*			Ex-Fumantes (n =125)**			Não Fumantes (n =258)***		
	RC	95% IC	P	RC	95% IC	P	RC	95% CI	P
Uso de Álcool									
Moderado (GM)	3.43	1.04-3.98	<0.001	2.82	1.21-2.72	0.028	1.22	1.02-1.63	0.032
Intenso (GI)	5.48	1.97-6.02	<0.001	3.75	1.21-4.13	0.012	2.17	1.03-2.21	0.031
Álcool Dependência (GD)	7.91	2.96-12.18	<0.001	4.12	1.63-5.91	<0.001	3.02	1.51-5.96	0.026
Idade									
≥45-55 anos	1.24	0.91-2.63	0.071	1.42	0.71-1.96	0.132	0.93	0.52-1.79	0.163
Gênero*									
Homens	1.56	0.38-2.72	0.283	1.27	0.41-2.12	0.285	1.02	0.23-1.92	0.452
Renda Familiar*									
<5 SMB	1.73	0.78-3.23	0.042	0.96	0.74-3.21	0.062	1.01	0.91-2.13	0.067
Nível educacional*									
<8 anos	0.96	0.18-3.71	0.078	0.85	0.23-2.91	0.083	0.627	0.14-2.02	0.074
Diabetes (sim)	1.14	0.92-3.96	0.061	0.83	0.23-3.18	0.382	0.94	0.25-3.21	0.071
Perda Dental	2.82	1.07-5.78	<0.001	2.73	1.02-3.82	<0.001	1.14	1.01-1.98	0.022

Diferenças estatisticamente significantes em negrito

Váriavel dependente: periodontite

Área sobre a curva ROC nos modelos: *0.726; **0.719; ***0.698

ARTIGO II

QUANTIFICAÇÃO DE PERIODONTOPATOGENOS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE DEPENDENTES E NÃO USUÁRIOS DE ÁLCOOL

Palavras: 4150

Tabelas: 6

Quantificação de Periodontopatógenos e Citocinas Pró-Inflamatórias em Indivíduos com Periodontite Dependentes e não Usuários de Álcool.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a influência do uso e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas sobre a quantificação subgingival de periodontopatógenos e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias do fluido gengival. **Materiais e métodos:** Este estudo caso-controle foi proposto a partir de um delineamento transversal onde 542 indivíduos foram estratificados segundo o consumo de álcool e condição periodontal. Dos 134 indivíduos identificados com periodontite, selecionou-se aleatoriamente 22 indivíduos não usuários ou usuários ocasionais de álcool (GNP- grupo controle) e outro com 22 dependentes de álcool (GDP- grupo caso). Os níveis (PCR-tempo real) de *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), *P. intermedia* (*Pi*), *E. corrodens* (*Ec*) e *F. nucleatum* (*Fn*) foram determinados no biofilme subgingival, enquanto IL-1 β (interleucina 1 β) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) foram quantificadas (por ELISA) em amostras de fluido gengival, coletadas dos mesmos sítios periodontais. Comparações intra e inter-grupos foram realizadas utilizando-se os testes estatísticos Mann-Whitney, Qui-quadrado, exato de Fisher e correlação de Spearman quando adequado ($p < 0,05$). **Resultados:** GDP apresentou maior perda dentária, maior índice de placa, maior percentual de sangramento e sítios com PS entre 4-6 mm além de contagens significativamente maiores de *Pi*, *Ec* e *Fn*. Concentrações de IL-1 β e TNF- α , níveis de *Aa* e *Pg* não diferiram entre os grupos. Em GNP contagens mais elevadas de *Aa* foram acompanhadas de níveis mais elevados de TNF- α enquanto redução de *Pg* se associou ao aumento de IL-1 β . Em GDP apenas o aumento de *Ec* correlacionou-se com aumento nos níveis de IL-1 β . **Conclusões:** Embora o perfil de citocinas tenha sido similar entre os grupos, dependentes de álcool apresentaram pior condição clínica periodontal e níveis mais elevados de *Ec*, *Fn* e *Pi*. **Palavras-chave:** alcoolismo; dependência alcoólica; periodontite; bactérias; citocinas.

INTRODUÇÃO

A ação do álcool como fator de risco tem sido investigada em relação a uma grande variedade de condições uma vez que seu consumo é responsável por cerca de 4% de todas as mortes no mundo e por 5% do contingente global de doenças. Além disso, é uma causa importante de desigualdades na saúde das pessoas com impacto social negativo devido ao alto custo e demanda de cuidados específicos (Beaglehole e Bonita, 2009). Por definição, inúmeras doenças e injúrias são causadas diretamente pelo efeito do álcool. Entretanto além de fator causal, existem outras doenças e injúrias cujo desenvolvimento apresenta o álcool como fator contribuinte (WHO, 1992).

Paralelamente às fortes evidências que suportam os efeitos deletérios do álcool sobre a saúde sistêmica, há algumas décadas os possíveis efeitos danosos do consumo ou da dependência de álcool sobre a cavidade bucal e inclusive sobre os tecidos periodontais foram reportados (Amaral et al. 2009). Desde então, no âmbito periodontal, esse fator comportamental não foi tão explorado quanto foram, por exemplo, outras condições ou doenças sistêmicas. Portanto, além do efeito direto sobre a condição periodontal, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas inclusive o potencial sinergismo entre o consumo de álcool e outros fatores de risco. Apesar de Tezal et al. (2001) terem afirmado que a associação entre ingestão de bebidas alcólicas e gravidade da doença periodontal foi independente dos padrões de higiene bucal, outros autores que observaram tal associação reconheceram a pobre higiene bucal como um achado comum dentre os usuários de álcool (Novacek et al. 1995; Amaral et al. 2009). Em adição, observa-se ausência de estudos sobre a gravidade da periodontite relacionados a perfil microbiológico e imunológico entre indivíduos dependentes e não dependentes alcoólicos.

Embora multifatorial, existem evidências que sustentam a importância de determinadas espécies bacterianas (Cortelli et al, 2005) na etiopatogênese da doença periodontal assim como a reação inflamatória em resposta a esse desafio microbiano. Devido à influência sobre a resposta do hospedeiro, fatores comportamentais como o consumo de bebidas alcoólicas, podem alterar a susceptibilidade do hospedeiro sendo responsáveis por variações tanto na prevalência quanto na gravidade das doenças periodontais (Nunn, 2003). Assim,

estudos epidemiológicos que investigaram essa relação revelaram uma associação positiva entre consumo de álcool e periodontite (Okomoto et al. 2006; Pitiphat et al. 2003; Shimazaki et al. 2005; Tezal et al. 2001e 2004, Amaral et al. 2008 e 2009; Sarfati et al. 2010). Entretanto, deve-se salientar que os mecanismos envolvidos na relação álcool-periodontite ainda requererem análises mais detalhadas como a quantificação de periodontopatógenos e de interleucinas pró-inflamatórias como previamente determinado em populações com perfis distintos (Schenkein et al 2007, Casarim et al, 2010).

Assim, o presente estudo avaliou em indivíduos com periodontite a provável influência do uso e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas na quantificação subgengival de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Prevotella intermédia* (*Pi*), *Eikenella corrodens* (*Ec*) e *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), e quantificação de interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no fluido gengival.

MATERIAIS E MÉTODOS

População estudada e estratégia amostral

Um estudo transversal (Lages et al. 2011) sobre a associação entre uso de álcool e doença periodontal foi conduzido em 542 indivíduos de ambos os gêneros, idade entre 35 e 55 anos, níveis sócio-econômico e educacional heterogêneos. A condição periodontal da população foi determinada por exame periodontal completo. Esses indivíduos foram estratificados segundo a frequência de ingestão de bebidas alcoólicas por meio de dois questionários: CAGE (*cut-down, annoyed, guilty, eye-opener*) proposto por Mayfield et al. (1974) e validado por Masur e Monteiro (1983); e, AUDIT (*alcohol use disorders identification test*) proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e realizado por Saunders et al. (1993).

Dos 542 indivíduos, 134 foram diagnosticados com periodontite e 87 foram voluntários para este estudo caso-controle, sendo 51 não usuários ou usuários ocasionais de álcool (grupo GNP) e 36 dependentes de álcool (grupo GDP). Subseqüentemente, selecionou-se aleatoriamente por sorteio, 22 indivíduos de cada grupo (GNP e GDP) que foram submetidos aos exames microbiológicos e imunológicos. Assim, um aninhamento caso-controle “pós hoc” a partir do estudo

transversal foi realizado, onde o grupo GNP foi tomado como controle e GDP como grupo caso.

O critério utilizado para definição de periodontite foi a presença de 4 ou mais dentes com 1 ou mais sítios com profundidade de sondagem (PS) \geq 4mm e nível clínico de inserção (NCI) \geq 3mm no mesmo sítio (López et al. 2002). Adicionalmente, não usuários ou usuários ocasionais de álcool foram definidos como a obtenção de escores zero nos instrumentos CAGE e AUDIT (frequência de uso = nunca ou $<$ 1/mês); enquanto escores CAGE \geq 2 e AUDIT $>$ 8 definiram o status de dependência alcoólica (frequência de uso \geq 4/semana) (Lages et al. 2011).

Este estudo foi desenvolvido segundo as normas de Ética em Pesquisa com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (protocolo 0094.0.203.000-10). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para serem recrutados para o estudo.

Critérios de exclusão:

(a) gravidez; (b) doenças debilitantes que comprometam o sistema imunológico (por exemplo, SIDA, neoplasias e doenças auto-imunes); (c) ocorrência de crescimento gengival induzido por drogas; (d) idade $<$ 35 anos e $>$ que 55 anos; (f) uso de maconha, cocaína, crack ou outras drogas ilícitas; (g) uso de terapia antimicrobiana e tratamento periodontal em prazo inferior a 3 meses do exame ; h) apresentar menos de 14 dentes na cavidade bucal.

Exame Clínico Periodontal

Em todos os exames clínicos periodontais registrou-se para cada paciente os dados de índice de placa (Silness & Loe, 1964), profundidade de sondagem (PS) registrando os maiores valores para quatro sítios de sondagem (vestibular, lingual, mesial e distal), nível clínico de inserção (NCI) registrando-se a maior medida das superfícies vestibular e lingual/ palatina e sangramento à sondagem (SS) avaliada no momento da medida da PS ou em até 30 a 60 segundos após e anotados para quatro sítios com valores dicotômicos (positivo ou negativo).

O conjunto de instrumental padronizado para o exame incluiu: pinça clínica, espelho bucal, sonda periodontal milimetrada (modelo Carolina do Norte - PCPUNC15BR - Hu-Friedy®). Os exames e entrevistas foram realizados por dois examinadores treinados e especialistas em Periodontia (FOC e EJPL).

Reprodutibilidade

Medidas de PS e NCI foram realizadas e repetidas com um intervalo de uma semana em 12 indivíduos selecionados aleatoriamente do grupo amostral inicial. Os resultados mostraram valores de Kappa ponderado para concordância intra e inter-examinadores para as medidas de PS e NCI >0.89 e coeficiente de correlação intra-classe $> 0,87$ ($p < 0,001$). No estudo piloto, um treinamento também foi realizado para os questionários AUDIT e CAGE. O coeficiente de concordância entre respostas foi calculado revelando uma concordância de 100% para a classificação dos indivíduos nos grupos propostos.

Procedimentos microbiológicos

Para cada voluntário as amostras subgengivais foram coletadas de 6 dentes (maior valor de PS/dente associado a sangramento; faces dentais não contiguas) após a limpeza supragengival com gaze estéril, isolamento com roletes de algodão e secagem delicada com jatos de ar. Um cone de papel absorvente estéril (# 30, Dentsply®) foi introduzido em cada bolsa periodontal e mantido em posição por 60 segundos (Cortelli et al., 2005). Os cones foram colocados no mesmo minitubo contendo 1,0mL de solução de Ringer e o pool congelado a -80°C .

Extração de DNA

Tanto o DNA das amostras clínicas quanto o das cepas bacterianas de referência utilizadas como controle foi extraído pelo método do fenolcloroformio (Fox et al., 1994). A concentração de DNA e a relação DNA/proteína foram avaliadas em espectrofotometro *Nanodrop* ND-100023 e o material foi armazenado a -20°C .

PCR em tempo real

Protocolos previamente validados (Maeda et al. 2003, Kato et al. 2005, Kozarov et al. 2006) foram selecionados para identificação/quantificação das bactérias de interesse utilizando-se inicializadores (*primers*) espécie-específicos baseados no estudo de Braga et al. (2010) (Tabela 1). Como controle positivo e negativo foi utilizado cepas bacterianas de referência (coleção do Laboratório de Microbiologia – UFMG). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

A confirmação da ocorrência de hibridização entre *primers* e DNA do microrganismo alvo e da inexistência de reação cruzada foi realizada por análise *in silico*, com o auxílio do programa *Blast24*. Tamanho, peso molecular, conteúdo G + C e temperatura de dissociação dos *amplicons* também foram avaliados.

As reações foram realizadas em um volume total de 20 μ L, contendo 0,25 μ M de cada *primer*. Para *A.a*, *Pg* e *Pi* os ciclos de reação utilizados foram: 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. Para *Ec*, a amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15s e 60°C por 1 min. Finalmente, para *Fn* empregou-se 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 10s, 65°C por 10s e 72°C por 20s. As reações foram realizadas em termociclador *Step One Real Time PCR Systems*, empregando-se o kit *SYBR Green PCR Master Mix 2X28*. Em cada set de reações, foram incluídos controles positivo e negativo interno (água Milli QR estéril). Os resultados foram analisados com o auxílio dos softwares *ABI SDS 2.2.2 Real Time PCR29* e *Step One Systems 30* (Life Technologies, USA).

A análise dos perfis de amplificação foi baseada no ciclo no qual o *Ct* é atingido; os resultados obtidos foram corrigidos automaticamente pelo *software*, de acordo com o valor correspondente ao nível basal de fluorescência, medido nos primeiros ciclos da reação, antes da detecção de amplificação.

No que se refere a avaliação de especificidade, dois procedimentos foram executados. No primeiro, a análise das curvas de dissociação foi realizada ao final de cada reação a fim de distinguir o sinal de fluorescência originado dos *amplicons* específicos daqueles relacionados com dimerização de *primers* ou outros artefatos. A avaliação foi feita entre 60°C e 95°C, com coleta de dados em intervalos de 0,1°C. Com o mesmo objetivo, foram realizadas reações utilizando como molde um *mix* contendo DNA de todas as cepas referência, exceto a amostra alvo para o par de *primers* em questão.

Os *amplicons* obtidos foram utilizados para a construção das curvas-padrão em cada set de reações. A cerca de 80 μ L do produto amplificado, foram adicionados aproximadamente 150 μ L de fenol-clorofórmio (1:1). A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA foi novamente extraído em 150 μ L de clorofórmio. Para precipitação do DNA, à fase aquosa acrescentou-se acetato de sódio 0,3M (2,6 μ mol/ μ L) e dois volumes de etanol absoluto sendo o material então incubado a -20°C, *overnight*. A suspensão foi centrifugada a 12000 x *g*, por 75min e, após evaporação do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi centrifugado a 12000 x *g* por 30min, o etanol descartado e o sedimento diluído em água Milli QR estéril. Em seguida, foram determinadas a concentração dos produtos amplificados e a relação DNA/proteína, em espectrofotômetro

Nanodrop ND-1000. Em seguida o material foi estocado em freezer a -20°C . Os valores das concentrações dos produtos amplificados calculados em $\text{ng}/\mu\text{L}$ foram, então, convertidos para número de moléculas de DNA/ μL [valores iniciais ($\text{g}/\mu\text{L}$) \div pelo peso molecular do *amplicon* (PB) X constante de Avogadro].

Os limites de detecção das reações de amplificação e a linearidade das curvas-padrão foram verificados utilizando diluições decimais seriadas dos produtos de PCR gerados pela amplificação do rDNA 16S das cepas referência. Foram realizadas diluições decimais dos *amplicons* para obtenção de concentrações da ordem de 10^7 a 10^2 moléculas de DNA/ μL . Alíquotas das diluições foram incluídas, em triplicata, em cada placa de reação. As análises de especificidade e eficiência das reações e o cálculo do R2 foram realizados com auxílio do *software Step One Systems*.

Procedimentos imunológicos

As amostras do fluido gengival foram coletadas dos mesmos sítios periodontais, após lavagem (para eliminação de resíduos sanguíneos) e intervalo de 60 a 90 segundos após o término da coleta microbiológica (Casarin et al., 2010). Sob isolamento relativo tiras de papel absorvente Periopaper (PerioCol Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA) foram introduzidas na bolsa periodontal até encontrar resistência moderada, onde permaneceu por 30 segundos. Em seguida, foi calculado o volume do fluido gengival (μl) (Periotron 6000 - IDE Interstate, Amityville, NY) e após essa quantificação, foi feito um pool das tiras de papel, as quais foram colocadas em minitubos secos e congeladas a -80°C .

Dosagem de IL-1 β E TNF- α no Fluido Gengival

No laboratório, os tubos foram descongelados, mecanicamente agitados por 30 segundos em solução PBS juntamente com o coquetel inibidor de protease PMSF (Sigma^R) e centrifugados (10 min. a 6.000rpm/4°C). Subseqüentemente, as quantificações de IL-1 β e TNF- α foram realizadas através de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA), empregando Kits comerciais (IL-1 β : Catálogo # HSLB00C e TNF- α : Catálogo # HSTA00D; R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA) segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, 50 μL da solução diluente de amostra foram adicionados nos poços de suas respectivas placas (IL-1 β ou TNF- α). Em seguida, o sobrenadante (150 μL para análise de IL-1 β ou 200 μL para análise de TNF- α) e os padrões (IL-1 β : 0-32pg/mL e TNF- α : 0-8pg/mL) foram acrescentados em cada poço e incubados por 3 horas. Após procedimento de lavagem (6x), 200 μL

dos respectivos conjugados foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por mais 2 horas. Após nova lavagem (6x), 50µL de substrato foram acrescentados em cada poço. Ao término do período de incubação (1 hora), 50µL da solução amplificadora foram adicionados e realizou-se uma nova incubação por 30 minutos. Finalmente adicionou-se 50µL da solução *Stop Solution*. A reação colorimétrica em cada poço foi monitorada com o emprego de um leitor de ELISA (comprimento de onda: 490nm). A quantificação foi realizada plotando os resultados relativos à absorbância de cada amostra com uma curva de calibração elaborada a partir de concentrações conhecidas dos respectivos antígenos. Todo o experimento foi executado em duplicata.

Análise estatística

A análise estatística incluiu uma caracterização descritiva da amostra de acordo com o grupo e segundo as variáveis de interesse e condição periodontal. As medidas descritivas são apresentadas em porcentagens e tabelas com a média, mínimo, máximo e desvio padrão (d.p.). A comparação entre os dois grupos quanto às variáveis contínuas foi realizada pelo teste Mann-Whitney e para variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Utilizou-se a correlação de Spearman (r) com o objetivo de avaliar as relações entre os níveis bacterianos, concentração de citocinas e condição periodontal nos grupos GNP e GDP. Em adição, para evitar efeito de confundimento do tabagismo, a mesma análise foi realizada excluindo indivíduos fumantes em ambos os grupos.

Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0 for Windows - SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Devido à perda amostral nos processamentos laboratoriais a amostra final foi composta por 21 indivíduos no grupo GNP e 20 indivíduos no grupo GDP. Os grupos foram homogêneos, em relação ao gênero, idade, tabagismo, diabetes e índice de massa corporal. Os dois grupos não diferiram em relação à ocorrência de sítios com

PS \geq 7 mm e NCI \geq 4 mm. Entretanto, outros parâmetros periodontais indicaram uma melhor condição clínica para GNP comparativamente a GDP. Não usuários ou usuários ocasionais apresentaram menor perda dentária, menor índice de placa, um menor percentual de sangramento e sítios com PS entre 4 e 6 mm (Tabela 2).

A análise microbiológica revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos GNP e GDP. *Pi*, *Ec* e *Fn* apresentaram contagens significativamente maiores no grupo GDP enquanto *Aa* e *Pg* não diferiram entre os dois grupos (Tabela 3).

A análise intra-grupo também revelou diferenças significativas em relação aos níveis bacterianos (Tabela 4). Os dependentes de bebidas alcoólicas apresentaram maiores contagens de *Fn* comparativamente às demais espécies. Nesse mesmo grupo as contagens de *Ec* e *Pi* foram significativamente mais elevadas que as de *Aa*. Similarmente, *Fn* exibiu os maiores níveis dentre os indivíduos do grupo GNP. Todavia, nesse último grupo apenas *Ec* foi detectado em níveis mais elevados comparativamente às demais bactérias (*Pi*, *Pg* e *Aa*), que exibiram níveis inferiores e comparáveis entre si.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, não foi observado diferenças significativas nas concentrações de IL-1 β e TNF- α entre os grupos GNP e GDP (Tabela3).

Os resultados mostraram uma correlação negativa significativa entre *Aa* e TNF- α no grupo GNP. Considerando-se que os valores se referem ao *ct*, isto indicou que contagens mais elevadas de *Aa* foram acompanhadas de níveis mais elevados da citocina. Ao contrário menores contagens de *Pg* foram acompanhadas de aumento de IL-1 β nesse mesmo grupo. Por outro lado, dentre os dependentes de bebidas alcoólicas apenas uma correlação foi significativa, i.e, o aumento de *Ec*. se correlacionou com aumento nos níveis de IL-1 β (5)

No grupo GNP, observou-se uma correlação negativa significativa entre IL-1 β e o percentual sítios com PS entre 4-6 mm e \geq 7 mm e também com o percentual de sítios com NCI \geq 4 mm. Assim, níveis mais elevados da citocina se associaram a redução desses percentuais. Além disso, contagens elevadas de *Ec* e *Pg* se correlacionaram com o aumento no percentual sítios com PS entre 4 e 6 mm (Tabela 6).

Já no grupo GDP, houve correlação negativa entre IL-1 β e vários parâmetros clínicos periodontais (ocorrência de sangramento e sítios com maior profundidade de sondagem, isto é PS entre 4 a \geq 7mm) . Nesse mesmo grupo o aumento no

percentual de sítios com NCI \geq 4 mm foi acompanhada de menores níveis de *Pg* (Tabela 6).

A análise excluindo fumantes (em GDP e GNP excluiu-se respectivamente, 6 e 4 indivíduos), reportou as seguintes diferenças em relação à análise para a amostra global: 1) ausência de diferenças significativas entre os grupos para os seguintes parâmetros clínicos: número de dentes presentes, índice de placa e % de sítios com SS; 2) no grupo GDP correlação significativa intra-grupo entre *Ec* e TNF- α ($r=0.603$; $p=0.022$) e ausência de correlação entre *Ec* e IL-1 β .

DISCUSSÃO

A fim de investigar a relação entre o consumo de álcool e a condição periodontal um primeiro estudo transversal foi conduzido por nosso grupo de pesquisa onde 542 indivíduos foram examinados e a associação entre periodontite e consumo de álcool determinada (Lages et al. 2011). Entretanto, como os danos clinicamente detectáveis são os resultados finais de complexas interações parasita-hospedeiro, a análise de parâmetros microbiológicos e imunológicos tem se mostrado necessária para elucidar a influência de determinados fatores de risco como moduladores da expressão da doença. Assim, o presente estudo enfocou a possível influência da ingestão de bebidas alcoólicas sobre indicadores microbiológicos e imunológicos locais em indivíduos com periodontite, respectivamente a quantificação subgingival de patógenos periodontais e a determinação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido gengival.

Em relação ao tamanho amostral, deve ser ressaltado que dos 87 indivíduos voluntários com periodontite do estudo transversal de Lages et al. (2011), aproximadamente 50% foram incluídos nesta investigação. Adicionalmente, estudos incluindo dependentes alcoólicos são difíceis frente aos graves problemas que estes indivíduos apresentam com relação ao comprometimento e estabilidade emocional.

Segundo Amaral et al. (2009) o efeito do biofilme como fator de confusão nos estudos sobre álcool e doença periodontal tem sido pobremente considerado. Por isso, é relevante salientar que no presente estudo, os dependentes de álcool apresentaram índices de placa mais elevados. Khocht et al. (2009) não observaram influência da frequência de escovação sobre os níveis de biofilme e relataram que a dependência de álcool pode estar associada a níveis aumentados de biofilme. Por

causar desidratação bucal e redução do fluxo salivar (Enberg et al., 2001) a ingestão excessiva de álcool parece contribuir para o aumento na velocidade de formação e acúmulo do biofilme.

Claramente, parte do biofilme é representada por um complexo consórcio de bactérias que inclui espécies patogênicas as quais podem ser detectadas em menores frequências e proporções em indivíduos periodontalmente saudáveis. O fato de periodontopatógenos serem encontrados em condições clínicas distintas mostra que tais bactérias são membros da microbiota indígena (Nonnenmacher et al 2004, Cortelli et al, 2008, Braga et al. 2010). Entretanto, deve-se considerar que determinadas espécies tem apresentado associação com o tipo e a gravidade da doença periodontal (Cortelli et al 2005). Análises quantitativas têm ajudado a entender melhor a relação microbiota vs. condição periodontal, pois além de diferenciar colonização de infecção torna mais clara a influência de fatores demográficos e comportamentais sobre tal relação (Fox et al, 1994, Aimetti et al, 2007, Ximenez et al, 2006).

Alguns estudos mostram não haver diferença na frequência de periodontopatógenos em condições clínicas distintas, presença e ausência de doença, levantando discussões se determinadas espécies podem ser consideradas como fator de prognóstico para a gravidade da periodontite (Braga et al. 2010).

No presente estudo, em ambos os grupos, *Fn* exibiu níveis significativamente superiores aos níveis das demais espécies. Já a análise inter-grupos revelou maiores contagens de *Pi*, *Ec* e *Fn* (Tabela 3) dentre os dependentes de bebidas alcoólicas (grupo GDP). Segundo Szabo (1999) a ingestão de álcool diminui os mecanismos de defesa primária predispondo o organismo ao maior crescimento bacteriano. Entretanto *Aa* e *Pg* não diferiram entre os grupos. Assim, as contagens destas bactérias embora compatíveis com o status de periodontite (Nonnenmacher et al. 2005, Kuboniwa et al. 2004, Boutaga et al. 2006) parecem ter sido menos influenciadas pela dependência de álcool. Coincidente aos nossos achados Braga et al. (2011) utilizando PCR-RT não identificou contagens de *Pg* como marcador para periodontite crônica em mulheres com e sem periodontite. Entretanto, nossos achados não corroboraram os resultados de Tezal et al. (2001) que observaram níveis mais altos de *Pg* no grupo de indivíduos com uso intenso de bebidas alcólicas.

Segundo Achur et al. (2010) um longo tempo de consumo de álcool ocasiona patologias associadas com células inflamatórias alteradas e respostas imunes adaptativas com aumento da incidência de infecções. O álcool é conhecido por alterar os níveis de citocinas no plasma em uma variedade de tecidos e órgãos. Assim, pesquisadores devem concentrar a atenção na identificação de biomarcadores de citocinas em modelos de abuso de álcool relacionados a diferentes doenças.

Poucos estudos foram realizados em relação a níveis de citocinas pró-inflamatórias associados ao consumo de álcool e doença periodontal. Irie et al. (2008) reportaram que o consumo crônico de álcool em ratos aumentou a produção de TNF- α revelando maior gravidade da inflamação em modelos de periodontite induzida por ligaduras. Gonzáles-Quintela et al. (2008) reportaram que níveis séricos de TNF- α são mais elevados em indivíduos alcoólatras, entretanto na presença de consumo leve a moderado, este efeito foi nulo.

Vários estudos têm demonstrado que produtos metabólicos de origem bacteriana são capazes de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias estando esse aumento associado a gravidade da periodontite (Schenkein et al. 2007, Tanaka et al. 2006). No presente estudo contagens mais elevadas de *Aa* foram acompanhadas de níveis mais elevados de TNF- α dentre os componentes do grupo GNP. Dentre os dependentes de álcool a análise de correlação indicou associação entre o aumento de *Ec* com o aumento nos níveis de IL-1 β (Tabela 5). Entretanto, resultados controversos foram observados para *Pg* no grupo composto por usuários ocasionais. Para esses indivíduos, menores contagens desta bactéria foram acompanhadas de aumento de IL-1 β .

No presente estudo apesar do grupo GDP ter apresentado pior condição periodontal e maior infecção por determinadas espécies bacterianas, diferenças nos níveis de IL-1 β e TNF- α não foram observadas entre os grupos. Alguns estudos (Felver et al. 1990, Bird et al. 1990, Schafer et al. 1995) têm justificado a maior gravidade da periodontite em indivíduos com uso intenso de bebidas alcoólicas devido à produção exarcebada da citocina TNF- α , entretanto os nossos resultados não confirmaram essas observações prévias. Deve-se mencionar que apesar de impactar negativamente o sistema imune, o consumo moderado de álcool pode ter

um efeito antiinflamatório inverso, associado a menor produção de IL-1 β e TNF- α (Mandrekar et al. 2006).

Nossos resultados não mostraram diferenças significativas nos achados microbiológicos e imunológicos quando analisados os dados para a amostra global e para não fumantes. Consubstanciando estes achados, diversos estudos têm mostrado influência controversa do fumo nos patógenos periodontais (Preber et al. 1992; Bostron et al. 2001; Haffajee et al. 2001; Michiya et al. 2011). Bostron et al. (2001) reportaram altas taxas de patógenos em fumantes, entretanto sem diferença estatisticamente significativa. Haffajee et al. (2001), reportaram que espécies de *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micra* and *P. nigrescens* foram significativamente maiores em fumantes e, em sítios com PS > 4mm comparados com não-fumantes. Giannopoulou et al (2003) reportaram influencia do fumo na composição de citocinas do fluido sulcular gengival. Em nosso estudo, fumantes foram homogêneos nos grupos e assim o fumo não alterou de forma significativa os nossos achados.

O perfil de citocinas pró-inflamatórias pesquisadas foi similar entre os grupos. Todavia, a análise de outros parâmetros periodontais revelou uma pior condição clínica periodontal dentre os indivíduos dependentes de álcool. Os dependentes de álcool também exibiram níveis mais elevados de três espécies bacterianas (*Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*). Alguns resultados da análise de correlação foram controversos em relação à influência do álcool sobre os parâmetros periodontais, salientando a necessidade de estudos adicionais.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES E FINANCIAMENTO:

Os autores declaram não existir conflitos de interesse relacionados a essa pesquisa. Suporte financeiro foi obtido do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq/Brasil – 474235/2010-6) e FAPEMIG (Fundação do Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Brazil - APQ-00207-11).

REFERENCIAS

1. Aimetti, M., Romano, F. & Nessi, F. (2007) Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **78**, 1718-1723.
2. Achur, R.N., Freeman, W.M. & Vrana, K.E. (2010) Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **5**, 83-91
3. Amaral, C.D.A., S., Luiz, R.R. & Leao, A.T. (2008) The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *Journal of Periodontology* **79**, 993-998.
4. Amaral, C.S., Vettore, M.V. & Leao, A. (2009) The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dentistry* **37**, 643-651.
5. Beaglehole, R. & Bonita, R. (2009) Alcohol: a global health priority. *Lancet* **27(373)**, 2173-2174.
6. Bird, G.L., Sheron, N., Goka, A.K., Alexander, G.J. & Williams, R.S. (1990) Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Annals of Internal Medicine* **112**, 917-920.
7. Boström, L., Bergström, J., Dahlén, G. & Linder, L.E. (2001) Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 212–219.
8. Boutaga, K., Van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & Savelkoul, P.H. (2006) The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 427-433.
9. Braga, R.R., Carvalho, M.A.R., Bruna-Romero, O., Teixeira, R.E., Costa, J.E., Mendes, E.N.M., Farias, L.M. & Magalhães, P.P. (2010) Quantification of five periodontal pathogens in female patients with and

without Chronic Periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe*, e1-e6 (early online).

10. Casarin, R.C., Ribeiro Edel, P., Mariano, F.S., Nociti, F.H., JR., Casati, M.Z. & Goncalves, R.B. (2010) Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **45**, 635-642.
11. Cortelli, J.R., Aquino, D.R., Cortelli, S.C., Carvalho-Filho, J., Roman-Torres, C.V. & Costa, F.O. (2008) A double-blind randomized clinical trial of subgingival minocycline for chronic periodontitis. *Journal of Oral Science* **50**, 259-265.
12. Cortelli, J.R., Cortelli, S.C., Jordan, S., Haraszthy, V.I. & Zambon, J.J. (2005) Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 860-866.
13. Enberg, N., Alho, H., Loimaranta, V. & Lenander-Lumikari, M. (2001) Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surgical Oral Medical Oral Pathology and Oral Radiology Endodontics*. **92**:292-8.
14. Felver, M.E., Mezey, E., Mcguire, M., Mitchell, M.C., Herlong, H.F., Veech, G.A. & Veech, R. L. (1990) Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* **14**, 255-259.
15. Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Paster, B.J., Shames, B. & Murphy, J.C. (1994) Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 1229-1237.
16. Giannopoulou, C., Cappuyns, I. & Mombelli, A. (2003) Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 996–1002

17. Gonzales-Quintela A., Campos, J., Loidi, L., Quintero, C., Perez, L.F., & Gude, F. (2008) Serum TNF-alpha levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms. *Alcohol* **42**, 513-518.
18. Haffajee, A.D. & Socransky, S.S. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 377-388.
19. Irie, K., Tomofuji, T., Tamaki, N., Sanbe, T., Ekuni, D., Azuma, T., Maruyama, T., & Yamamoto T. (2008) Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *Journal of Dental Research* **87**, 456-460.
20. Kato, H., Yoshida, A., Awano S., Ansai, T., & Takerara, T. (2005) Quantitative detection of volatile sulfur compound-producing microorganisms in oral specimens using real-time PCR. *Oral Disease* **11**, 67-71.
21. Kawada, M., Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Saito, T., Oho, T. & Koga, T. (2004) Prevalence of Porphyromonas gingivalis in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 289-292.
22. Khocht, A., Schleifer, S.J., Janal, M.N. & Keller, S. (2009). Dental care and oral disease in alcohol-dependent persons. *Journal of Substance Abuse Treatment* **37**, 214-218.
23. Kozarov, E., Sweier, D., Shelburne, C., Progulske-Fox, A. & Lopatin, D. (2006) Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes and Infection* **8**, 687-693.
24. Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K.R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T. & Shizukuishi, S. (2004) Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 168-176.
25. Lages, E.P.L, Costa, F.O., Lages, E.M.B., Cota, L.O.M., Magalhães, R.C., Cortelli, S.C., Cortelli, J.R. (2011) Risk variables in the association

between frequency of alcohol consumption and periodontitis. (Artigo aceito para publicação no Journal Clinical Periodontology).

26. Lopez, N.J., Smith, P.C. & Gutierrez, J. (2002) Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *Journal of Dental Research* **81**, 58-63.
27. Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M. Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. & Takashiba, S. (2003) Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 2003;39:81-86.
28. Mandrekar, P., Catalano D., White B. & Szabo G. (2006) Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor - kappa B and induction of interleukin 10. Alcoholism: *Clinical and Experimental Research* **27**:1351-1359.
29. Masur, J. & Monteiro, M.G. (1983) Validation of the "CAGE" alcoholism screening test in a Brazilian psychiatric inpatient hospital setting. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **16**, 215-218.
30. Mayfield, D., Mcleod, G. & Hall, P. (1974) The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument. *The American Journal of Psychiatry* **131**, 1121-1123.
31. Michiya Kubota, Mariko Tanno-Nakanishi, Satoru Yamada, Katsuji Okuda, Kazuyuki Ishihara (2011) Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *Biomed Central Oral Health* **11**, 1 (early online doi: 10.1186/1472-6831-11-10).
32. Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Rochon, J., Flores-De-Jacoby, L., Mutters, R. & Heeg, K. (2005) Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *Journal of Periodontology* **76**, 1542-1549.

33. Novacek, G., Plachetzky, U., Pötzi R, Lentner, S., Slavicek, R., Gangl, A. & Ferenci, P. (1995) Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis – Role of etiology of liver disease. *Journal of Hepatology* **22**, 576-582.
34. Nunn, M.E. (2003) Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology 2000* **32**, 11-23.
35. Okamoto, Y., Tsuboi, S., Suzuki, S., Nakagaki, H., Ogura, Y., Maeda, K. & Tokudome, S. (2006) Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *Journal of Periodontal Research* **41**, 560-566.
36. Pitiphat, W., Merchant, A.T., Rimm, E.B. & Joshipura, K.J. (2003) Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Dental Research* **82**, 509-513.
37. Preber, H., Bergstrom, J. & Linder, L.E. (1992) Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 667–671
38. Saunders, J.B., Aasland, O.G., Babor, T.F., De la Fuente, J.R. & Grant, M. (1993) Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction* **88**, 791-804.
39. Schafer, C., Schips, I., Landig, J., Bode, J.C. & Bode, C. (1995) Tumor-necrosis-factor and interleukin-6 response of peripheral blood monocytes to low concentrations of lipopolysaccharide in patients with alcoholic liver disease. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **33**, 503-508.
40. Schenkein, H.A., Barbour, S.E. & Tew, J.G. (2007) Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **45**, 113-127.
41. Shimazaki, Y., Saito, T., Kiyohara, Y., Kato, I., Kubo, M., Iida, M. & Yamashita, Y. (2005) Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *Journal of Periodontology* **76**, 1534-1541.

42. Silness, J. & Loe, H. (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.
43. Szabo G; (1999) Consequences of Alcohol Consumption on Host Defence. *Alcohol & Alcoholism* 34:830-841.
44. Tanaka, S., Fakher, M., Barbour, S.E., Schenkein, H.A. & Tew, J.G. (2006) Influence of proinflammatory cytokines on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* specific IgG responses. *Journal of Periodontal Research* **41**, 1-9.
45. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2001) The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *Journal of Periodontology* **72**, 183-189.
46. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2004) Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 484-488.
47. World Health Organization. (1992) *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines, Tenth Revision*. Geneva: World Health Organization.

TABELA 1 – CONDIÇÕES DO PCR EM TEMPO REAL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS E TAMANHO ESPERADO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Bactéria (tamanho do amplicon – pb)	Primers 5' - 3'	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (77 bp)	F: CTTACCTACTCTTGACATCCGAA R: ATGCAGCACCTGTCTCAAAGC	60° C	Maeda et al. (2003)
<i>Eikenella corrodens</i> (50 bp)	F: GGGGAAGAAAAGGGAAGTGCT R: TCTTCAGGTACCGTCAGCAAAA	60° C	Kazarov et al. (2006)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (101 bp)	F: CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT R: TGGTCCTCACTGATTCACACAGA	65° C	Kato et al. (2005)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (378 bp)	F: CTTGACTTCAGTGGCGGCAG R: AGGGAAGACGGTTTTACCA	60° C	Maeda et al. (2003)
<i>Prevotella intermedia</i> (339 bp)	F: AATACCCGATGTTGTCCACA R: TTAGCCGGTCCTTATTCGAA	60° C	Maeda et al. (2003)

Baseado em Braga et al. (2010)

TABELA 2- VARIÁVEIS DE INTERESSE E CONDIÇÃO PERIODONTAL DA AMOSTRA

Variáveis de interesse	GNP n = 21	GDP n = 20	P
Gênero			
Feminino	10 (47,6%)	8 (40,0%)	0,623*
Masculino	11 (52,4%)	12 (60,0%)	
Idade	42,5 ± 4,5	47,4 ± 7,6	0,071***
Diabetes	1 (4,7%)	2 (10,5%)	0,231**
Hábito de fumar	4 (19,0%)	6 (30,0%)	0,484**
IMC	24,6 ± 2,2	25,2 ± 2,6	0,630***
Condição Periodontal			
Número de dentes	26,1 ± 4	22,7 ± 5,0	0,006***
Índice de placa	0,8 ± 0,9	1,5 ± 0,9	0,010***
% sítios com SS	17,6 ± 25,1	29,1 ± 25,7	0,019***
% sítios com PS ≥ 7 mm	2,3 ± 4,4	3,7 ± 5,9	0,054***
% sítios com PS 4-6 mm	6,5 ± 5,2	15,3 ± 11,5	0,001***
% sítios NCI ≥ 4 mm	7,2 ± 9,0	16,4 ± 19,8	0,107***

*teste Qui-quadrado; ** teste exato de Fisher; *** teste Mann-Whitney; valores significativos em negrito

GNP= grupo não usuário/ocasional de álcool periodontite; GDP= grupo dependente álcool periodontite;SS=sangramento à sondagem; PS= profundidade de sondagem; NCI= nível clínico de inserção.

TABELA 3. ANÁLISE COMPARATIVA INTER-GRUPOS PARA PERIODONTOPATÓGENOS (PCR-RT) E CITOCINAS

Patógenos*	Grupo	Medidas descritivas					P***
		Mínimo	Máximo	Mediana	Média	d.p.	
Pi	GNP	21,56	38,21	31,17	31,06	4,30	0,015
	GDP	15,63	34,00	26,89	26,44	5,73	
Ec	GNP	20,95	35,93	27,35	27,82	3,29	0,014
	GDP	21,48	31,95	24,95	25,57	2,92	
Aa	GNP	26,49	36,68	30,90	31,14	2,75	0,794
	GDP	21,11	35,68	32,01	30,17	4,75	
Fn	GNP	18,16	34,04	22,68	23,27	4,22	0,004
	GDP	16,59	26,13	19,08	19,94	3,03	
Pg	GNP	20,01	35,75	31,69	29,34	5,16	0,744
	GDP	18,34	35,53	31,10	28,86	5,42	
CITOCINAS**	Grupo						P***
IL-1β	GNP	0,91	51,28	9,13	14,79	15,87	0,085
IL-1β	GDP	0,78	51,36	3,10	7,47	11,20	
TNF-α	GNP	0,00	21267,87	29,52	2818,51	5906,14	0,942
TNF-α	GDP	0,00	2481,13	107,97	499,64	746,59	

* medidas em ct; ** medidas em absorbância; ***teste Mann-Whitney; valores significativos em negrito

GNP= grupo não usuário/ocasional de álcool periodontitel; GDP= grupo dependente álcool periodontite; *Pg*=*P.gingivalis*; *Aa*=*A.actinomycetemcomitan*;; *Pi*=*P.intermedia*; *Ec*=*E.corrodens*; *Fn*=*F.nucleatum*; IL-1 β = interleucina 1 β eta; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TABELA 4. ANÁLISE COMPARATIVA INTRA-GRUPOS ENTRE PERIODONTOPATÓGENOS (PCR-RT)

Grupo	Patógenos*	Medidas descritivas					P**
		Mínimo	Máximo	Mediana	Média	d.p.	
GNP	Pi	21,56	38,21	31,17	31,06	4,30	< 0,001
	Ec	20,95	35,93	27,35	27,82	3,29	
	AA	26,49	36,68	30,90	31,14	2,75	
	Fn	18,16	34,04	22,68	23,27	4,22	
	Pg	20,01	35,75	31,69	29,34	5,16	
Fn < Ec < (Pi = Pg = Aa)							
GDP	PI	15,63	34,00	26,89	26,44	5,73	< 0,001
	Ec	21,48	31,95	24,95	25,57	2,92	
	AA	21,11	35,68	32,01	30,17	4,75	
	Fn	16,59	26,13	19,08	19,94	3,03	
	Pg	18,34	35,53	31,10	28,86	5,42	
Fn < (Ec, Pi, Pg e Aa) / (Ec e Pi) < Aa							

*Medida em ct; ** Teste de Friedman; valores significativos em negrito

GNP= grupo não usuário/ocasional de álcool periodontitel; GDP= grupo dependente álcool periodontite; Pg=*P.gingivalis*; Aa=*A.actinomycescomitan*; Pi=*P.intermedia*; Ec=*E.corrodens*; Fn=*F.nucleatum*

TABELA 5. CORRELAÇÃO INTRA-GRUPO ENTRE PERIODONTOPATOGENOS E CITOCINAS

Grupo	Citocinas	Patógenos				
		Pi	Ec	Aa	Fn	Pg
GNP	IL-1 β	0,044	0,024	-0,235	-0,419	0,562
		(0,861)	(0,926)	(0,347)	(0,083)	(0,015)
	TNF- α	0,146	0,337	-0,503	-0,045	0,087
		(0,564)	(0,172)	(0,033)	(0,858)	(0,730)
GDP	IL-1 β	-0,029	-0,504	-0,174	-0,248	-0,254
		(0,905)	(0,024)	(0,462)	(0,291)	(0,281)
	TNF- α	-0,303	0,429	-0,276	0,204	-0,279
		(0,195)	(0,059)	(0,239)	(0,388)	(0,233)

*Correlação de Spearman, valores de p entre parênteses e significativos em negrito

GNP= grupo não usuário/ocasional de álcool periodontite; GDP= grupo dependente álcool periodontite; Pg=*P.gingivalis*; Aa=*A.actinomycescomitans*; Pi=*P.intermedia*; Ec=*E.corrodens*; Fn=*F.nucleatum*; IL-1 β = interleucina 1 β eta; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TABELA 6. CORRELAÇÃO INTER-GRUPOS ENTRE PERIODONTOPATÓGENOS (PCR-RT) E CITOCINAS COM A CONDIÇÃO PERIODONTAL

Dados periodontais	Grupo	Patógenos					Citocinas	
		PI	Ec	Aa	Pg	Fn	IL-1 β	TNF- α
% sítios com SS	GNP	-0,12 (0,596)	-0,27 (0,234)	0,06 (0,782)	-0,35 (0,123)	-0,18 (0,439)	-0,45 (0,060)	-0,18 (0,466)
	GDP	-0,17 (0,462)	0,04 (0,855)	0,08 (0,748)	0,23 (0,332)	0,06 (0,801)	-0,54 (0,013)	0,10 (0,662)
% sítios com NCI \geq 4 mm	GNP	0,05 (0,837)	-0,02 (0,928)	0,28 (0,214)	-0,22 (0,329)	-0,03 (0,891)	-0,56 (0,016)	-0,05 (0,844)
	GDP	0,07 (0,767)	-0,22 (0,359)	0,28 (0,240)	0,45 (0,045)	-0,19 (0,433)	-0,38 (0,103)	-0,22 (0,356)
% sítios com PS 4-6 mm	GNP	-0,17 (0,462)	-0,44 (0,045)	-0,15 (0,515)	-0,47 (0,030)	-0,28 (0,225)	-0,79 (0,001)	0,00 (0,996)
	GDP	-0,22 (0,346)	0,01 (0,965)	-0,07 (0,767)	0,15 (0,533)	0,07 (0,774)	-0,63 (0,003)	0,09 (0,704)
% sítios com PS \geq 7 mm	GNP	0,13 (0,579)	0,01 (0,963)	0,12 (0,600)	-0,40 (0,075)	0,21 (0,357)	-0,80 (0,001)	0,00 (0,998)
	GDP	-0,39 (0,090)	0,16 (0,507)	0,01 (0,954)	0,20 (0,388)	-0,17 (0,474)	-0,65 (0,002)	0,05 (0,831)

GNP= grupo não usuário/ocasional de álcool periodontite; GDP= grupo dependente álcool periodontite; *Pg*=*P.gingivalis*; *Aa*=*A.actinomycetemcomitans*; *Pi*=*P.intermedia*; *Ec*=*E.corrodens*; *Fn*=*F.nucleatum*; IL-1 β = interleucina 1 β eta; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; SS=sangramento à sondagem; PS= profundidade de sondagem; NCI= nível clínico de inserção; valores de p entre parênteses e significativos em negrito.

6. CONCLUSÕES

O estudo epidemiológico transversal concluiu que a prevalência de periodontite em usuários de álcool foi alta e, de forma incremental, frequência e dependência ao álcool aumentaram a chance de ocorrência de periodontite, principalmente em fumantes.

Variáveis de risco como tabagismo e perda dental foram significativamente associados à ocorrência de periodontite.

O estudo microbiológico e imunológico em indivíduos dependentes e não usuários de álcool, revelou que o perfil de citocinas pró-inflamatórias pesquisadas foi similar entre estes indivíduos. Todavia, a análise de outros parâmetros periodontais revelou uma pior condição clínica periodontal dentre os indivíduos dependentes de álcool. Os dependentes de álcool também exibiram níveis mais elevados de três espécies bacterianas (*Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*). Alguns resultados da análise de correlação levaram a resultados controversos em relação à influência do álcool sobre os parâmetros periodontais.

Este estudo salienta a necessidade de estudos futuros da associação entre álcool e doença periodontal, particularmente os de delineamento longitudinal e ensaios clínicos randomizados.

Assim, esta pesquisa recomenda campanhas e estratégias educativas e preventivas no âmbito da saúde geral que devem atentar também para os efeitos maléficos do álcool na condição periodontal.

7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

1. ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal disease: an overview. *Periodontol. 2000*, Chicago, v.29, p.7-10, June 2002.
2. BEAGLEHOLE, R. & BONITA, R. Alcohol: a global health priority. *Lancet* 27(373), p. 2173-2174, 2009.
3. COSTA F. O., GUIMARÃES, A. N., COTA, L. O. M., PATARO, A. L., TAKESHI, K. S., CORTELLI, S. C., COSTA, J. E. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J. Oral Science*, v.51, n.2, p.199-206, 2009.
4. GALDURÓZ, J. F. C.; CAETANO, R. Epidemiology of alcohol use in Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.26, (supl I), p.3-6, 2004.
5. JANSSON, L. Association between alcohol consumptions and dental health. *J. Clin. Periodontol.*, v.35, n.5, p.379-384, May 2008.
6. NISHIDA, N.; TANAKA, M.; HAYASHI, N.; NAGATA, H.; TAKESHITA, T.; NAKAYAMA, K.; MORIMOTO, K.; SHIZUKUISHI, S. Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *J. Dent. Res.*, v.83, n.2, p.161-165, Feb. 2004.
7. NOVACEK, G.; PLACHETZKY, U.; POTZI, R. et al. Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis; role of etiology of liver disease. *J. Hepatol.*, v.22, p.576-582, 1995.
8. OKOMOTO, Y.; TSUBOI, S.; SUZUKI, S.; NAKAGAKI, H.; OGURA, Y.; MAEDA, K.; TOKUDOME, S. Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males. *J. Periodontal Res.*, v.41, n.6, p.560-566, Dec. 2006.
9. PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol. 2000*, v.14, p. 9-11, 1997.
10. PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol. 2000*, v.42, p.80-87, 2006.
11. PITIPHAT, W.; MERCHANT, A. T.; RIMM, E. B.; JOSHIPURA, K. J. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J. Dent. Res.*, v.82, n.7, p.509-513, July 2003.
12. SAKKI, T.K.; KUNUUTTLA, M.L.; VIMPARI, S.S.; HARTKAINEN, M. S. Association of lifestyle with periodontal health. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.23, n.8, p.155-158, June 1995.

13. SCHWARTZ, Z.; GOULTSCHIN, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol.* 2000, v.14, p.158-172, June 1997.
14. SHIMAZAKI, Y.; SAITO, T.; KIYOHARA, Y.; KATO, I.; KUBO, M.; IIDA, M.; YAMASHITA, Y. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama study. *J. Periodontol.*, v.76, n.9, p.1534-1541, Sept. 2005.
15. SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; HAFFAJEE, A. D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v.29, n.3, p.260-268, Mar. 2002.
16. TEZAL, M.; GROSSI, S. G.; HO, A. W.; GENCO, R. J. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J. Periodontol.*, v.72, n.2, p.183-189, Feb. 2001.
17. TEZAL, M.; GROSSI, S. G.; HO, A. W.; GENCO, R. J. Alcohol consumption and periodontal disease. The third national health and nutrition examination survey. *J. Clin. Periodontol.*, v.31, n.7, p.484-488, July 2004.
18. TRAVIS, J.; POTEPA, J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1477, n.1-2, p.35-50, Mar. 2000.

8. ANEXOS

ANEXO A : COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0094.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Fernando de Oliveira Costa
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de junho de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Aspectos epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos da associação entre alcoolismo e doença periodontal"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B

QUESTIONÁRIO AUDIT

1. Com qual frequência você utiliza bebidas com álcool?			
	(0) nunca		(2) 2-4 vezes ao mês
	(1) mensalmente ou menos		(3) 2-3 vezes por semana
			(4) 4 ou mais vezes por semana
2. Quantas bebidas alcoólicas você costuma tomar nesses dias?			
	(0) 1 ou 2		(2) 5 ou 6
	(1) 3 ou 4		(3) 7 a 9
			(4) 10 ou mais
3. Com que frequência toma mais que seis <i>drinks</i> em uma única ocasião?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente
			(4) quase diária
4. Com que frequência no último ano você se sentiu incapaz de parar de beber depois que começou?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente
			(4) quase diária
5. Com que frequência no último ano você não conseguiu fazer algo pela bebida?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente
			(4) quase diária
6. Com que frequência no último ano você precisou beber de manhã para se recuperar de uma bebedeira?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente
			(4) quase diária
7. Com que frequência no último ano você sentiu remorso após beber?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente

			(4) quase diária
8. Com que frequência no último ano você não conseguiu se lembrar o que aconteceu na noite anterior pela bebida?			
	(0) nunca		(2) mensalmente
	(1) menos que mensalmente		(3) semanalmente
			(4) quase diária
9. Você já se machucou ou machucou alguém como resultado do seu uso de álcool?			
	(0) não		
	(2) sim, mas não no último ano		
	(4) sim, no último ano		
10. Algum parente ou amigo ou médico ou outro profissional de saúde se preocupou com seu hábito ou sugeriu que parasse?			
	(0) não		
	(2) sim, mas não no último ano		
	(4) sim, no último ano		

Some os números em parênteses. Um valor maior que 8 indica problemas com bebidas alcoólicas.

ANEXO C

QUESTIONÁRIO CAGE

1. Alguma vez sentiu que deveria diminuir a bebida?			
<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
2. Pessoas o incomodam porque reclamam do seu modo de beber?			
<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
3. Alguma vez você já se sentiu mal ou culpado por beber?			
<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
4. Você bebeu pela manhã para acalmar os nervos ou para se livrar de uma ressaca (ao acordar)			
<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não

Este teste é marcado pela atribuição de 1 ponto para cada "sim" como resposta. O ponto de corte de duas respostas positivas (≥ 2) identifica indivíduos dependentes de bebidas alcoólicas.

ANEXO D**VERSÃO INGLESA ACEITA NO JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY****RISK VARIABLES IN THE ASSOCIATION BETWEEN FREQUENCY OF ALCOHOL CONSUMPTION AND PERIODONTITIS****Running title**

Association between alcohol consumption and periodontitis.

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interest. This study was supported by grants from the Research Support Foundation of Minas Gerais (FAPEMIG/APQ-00207-11) and National Research Council (CNPq/Brazil – 474235/2010-6)

ABSTRACT

Objective: Investigate the association between the frequency of alcohol consumption and periodontitis. Moreover, evaluate the influence of biological, behavioural, and social risk variables in this association.

Methods: Sample was comprised by 542 subjects of both genders, 35-55 years of age, who underwent a complete periodontal examination, and was divided in 4 groups according to the frequency of alcohol use, based on AUDIT and CAGE instruments: a) no or occasional alcohol use (NA), b) moderate alcohol use (MA), c) intense alcohol use (IA), and d) alcohol dependence (DA). Associations between the occurrence of periodontitis and potential risk variables were analyzed by univariate and multivariate logistic regression stratified by smoking status when appropriate.

Results: The prevalence of periodontitis in NA, MA, IA, and DA groups were 17.2%, 24.0%, 29.6%, and 53%, respectively. Alcohol odds ratio (OR) estimates significantly increased with an increase in consumption frequency (DA>IA>MA>NA; $p < 0.05$) and were approximately two times higher in smokers (OR=3.43 to 7.91) compared to non-smokers (OR=1.22 to 3.02).

Conclusion: Occurrence of periodontitis among alcohol users were high and the frequency of alcohol consumption increased the odds of periodontitis incrementally mainly in smokers.

Keywords: alcohol, periodontitis, prevalence, risk factors.

Word count: 3,498

04 tables

01 figure

Clinical Relevance

Rationale for the study: Data on the association between alcohol consumption and periodontitis are controversial. In addition, few studies evaluated this association among subjects with alcohol dependence.

Main findings: Prevalence of periodontitis among alcohol users were high (24% to 53%). Risk variables such as alcohol use frequency, smoking, and number of lost teeth were significantly associated with the occurrence of periodontitis.

Clinical implications: Increased frequency of alcohol consumption was associated with increased odds of having periodontitis, mainly in smokers. The association of periodontitis and increased alcohol use, especially in smokers, should be considered when developing preventive strategies in general health services.

INTRODUCTION

It is well known that the complex interaction between the micro flora of the oral cavity and the host organism is an important issue in the understanding of causal associations between systemic conditions and periodontal diseases susceptibility. Classically, diabetes, smoking, immunosuppression, hormonal changes, stress, medication, and alcoholism are recognized factors that can alter the pathogenesis, the expression, and the clinical management of periodontal diseases (Albandar et al. 2002, Costa et al. 2009, Sarfati et al. 2010).

According to Tezal et al. (2001), the consumption of alcoholic beverages was associated with the severity of periodontal disease independently of oral hygiene levels. By contrast, other studies suggested that the severity of periodontitis was associated with behavioural risk factors, although a poor oral hygiene level was a common finding among alcohol users (Novacek et al. 1995, Amaral et al. 2009).

The abusive alcohol use is considered a serious global problem that favours a life style that can bring social, economic, and health problems (Casswell, 2011). A study comprising 8,589 subjects in Brazil reported that 68.7% of the sample was composed by alcohol users and 11.2% were considered alcohol dependents (Amaral et al. 2008).

In the last decade, conflicting findings were reported on the association between alcohol consumption and periodontitis (Sakki et al. 1995, Nishida et al. 2004, Okomoto et al. 2006, Pitiphat et al. 2003, Shimazaki et al. 2005, Tezal et al. 2001, Tezal et al. 2004, Amaral et al. 2009, Sarfati et al. 2010). Therefore, studies with greater methodological rigor on the association between alcohol consumption and periodontitis should be conducted, especially focusing on the alcohol exposure gradients and periodontitis definition. Moreover, few studies have evaluated alcohol

dependence (Amaral et al. 2008). According to previous studies, it was hypothesized that higher alcohol consumption was associated with worse periodontal condition.

The present study aimed to investigate the association between the frequency of alcohol consumption and periodontitis; in addition, investigate the influence of biological, behavioural, and social risk variables in this association.

METHODS

Study Sample

In the present cross sectional study, complete periodontal examinations, as well as interviews for collecting biological, behavioural and social variables, were performed in a convenience sample of 542 subjects, from June 2008 to December 2010. It was approved by the Ethics Research Committee of the Federal University of Minas Gerais (COEP/UFMG protocol #0094.0.203.000-10).

All subjects were selected from a single medical/dental waiting list for health care in general practice of 1420 subjects at 3 Health Centres from the west region of Belo Horizonte city, Brazil. Subsequent to the analysis of medical records and the exclusion of subjects aged <35 and >55 years, 1010 subjects were determined to be eligible and were invited through telephone calls to participate in the study. At that time, 197 subjects could not be contacted and 813 subjects were scheduled for clinical examinations and interviews. From this total, 173 did not meet the inclusion/exclusion criteria, 79 did not attend scheduled exams/interviews, 6 refused to undergo periodontal examination alleging potential discomfort, and 13 refused to answer alcohol related questionnaires. A flowchart of sampling strategy is presented in Figure 01. The final sample for the present study comprised 542 subjects from both genders, 35-55 years of age (47.3 ± 5.7), heterogeneous socioeconomic and

educational levels. In attempt to reduce variation resulting from a broad age range, the present study focused on a main age group of 35-55 years.

The following 2 questionnaires were used to determine the frequency and intensity of alcohol consumption: 1) AUDIT – Alcohol Use Disorders Identification Test (Saunders et al., 1993), comprised by 10 questions, being scores >8 indicating alcohol use problems; 2) CAGE – Cut-down, Annoyed, Guilty, Eye-opener (Mayfield et al. 1974; Ewing 1984), comprised by 4 questions, being scores ≥ 2 indicating alcohol dependence. Both questionnaires were validated for the Brazilian population (Masur et al. 1983, Mendoza-Sassi & Béria, 2003). In this manner, subjects were categorized according to AUDIT and CAGE scores in 4 groups: a) no use or occasional alcohol use (NA) – never used or frequency of use less than monthly, AUDIT and CAGE scores = 0; b) moderate alcohol use (MA) – frequency of use 2-4 times a month, AUDIT score ≤ 8 and CAGE score = 0; c) intense alcohol use (IA) – frequency of use 2-3 times a week, AUDIT score ≥ 8 and CAGE score ≤ 1 ; d) alcohol dependence (DA) – frequency of use 4 or more times a week, AUDIT score >8 and CAGE score ≥ 2 .

After signing an informed consent, subjects were asked about their medical history, socio-demographic data, AUDIT and CAGE questionnaires by one examiner, followed by clinical examination by other examiner blinded to the interviews. In addition, subjects presenting periodontal treatment needs were directly referred to specialized public Dental Care Units. Subjects classified as presenting intense alcohol use (IA group) or alcohol dependence (DA group) were instructed to seek specialized treatment in the Psychotropic Drugs Care Unit of the Clinics Hospital of the Federal University of Minas Gerais and in the Association of Alcoholics Anonymous of Belo Horizonte city.

Exclusion criteria

Subjects were excluded from the study if: a) pregnant women; b) presenting debilitating diseases that compromise the immune system (HIV/AIDS, neoplasias, auto-immune diseases); c) presenting drug-induced gingival overgrowth; d) age <35 years or >55 years; f) using illicit drugs (cannabis, cocaine, crack, others); g) using antibiotics in a period less than 3 months prior to examinations; h) presenting less than 14 teeth in the oral cavity.

Sample Characterization

Data related to sample characteristics were collected: gender, age (35-55 years), family income [Brazilian minimum salary = approximately to \$258 Euros (BMS <5 or ≥5)], educational level (<8 or ≥8 years), cohabitation status (with or without companion), plaque index, last dental visit (last 2 years, 2-5 years, >5 years), tooth loss (mean number of lost teeth), smoking [non-smokers, former smokers and smokers for those who reported having smoked less than or more than 100 cigarettes during life time, respectively (Tomar & Asma, 2000)], diabetes [glycaemic values >126 mg /dl or those taking hypoglycaemic agents for more than 2 weeks (American Diabetes Association, 2005)], and body mass index (BMI:<25 and ≥25 Kg/m²).

Clinical periodontal examination

Periodontal parameters were collected for all subjects at 4 sites (vestibular, lingual, mesial, and distal) in all present teeth: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing [(BOP) evaluated 30 to 60 seconds after probing

measurements and recorded as present/absent], lost teeth and plaque index (Silness & L oe, 1964). The full-mouth periodontal examination was performed using manual periodontal probe (PCPUNC15BR – Hu-Friedy[®]). All examinations and interviews were performed by 2 trained periodontists (FOC and EJPL).

Periodontitis definition

Periodontitis was defined as the presence of 4 or more teeth with 1 or more sites with PD \geq 4mm and CAL \geq 3mm at the same site (L opez et al. 2002).

Intra- and inter-examiner agreement

Measurements of PD and CAL were performed and repeated after 1 week in 12 subjects randomly selected from a pilot study sample (n = 60). Results showed weighted kappa values >0.89 and intraclass correlation coefficient >0.87 for intra- and inter-examiner agreement ($p < 0.001$). A training and calibration process regarding AUDIT and CAGE questionnaires were also performed in the pilot study. An agreement correlation coefficient was calculated for CAGE and AUDIT questionnaire answers, and 100% of agreement was reached in classifying individuals in the 4 proposed study groups.

Statistical analysis

Statistical analysis included a descriptive characterization of the sample according to variables of interest. Group comparisons by means of Chi-squared test and ANOVA were performed when appropriate. When equal variances were assumed, variables were compared by means of ANOVA and Bonferroni post hoc test. When equal variances were not assumed, variables were compared by means of Welch and

Tamhane post hoc test.

Distribution of independent variables (alcohol use and explanatory variables) by periodontitis status, crude odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CI) were calculated. The effect of variables in the occurrence of periodontitis was evaluated through multivariate logistic regression. To evaluate the interaction effect of smoking and alcohol and to avoid the treatment of smoking as a confounding factor, three distinct models logistic regression stratified by smoking status (smokers, former smokers and nonsmokers) were performed. Variables presenting a p-value $p < 0.25$ in the bivariate analysis were then included a multivariate model of non-cases (0) and cases (1) of periodontitis and manually removed (step by step) until the log-likelihood ratio test indicated that no variable should be removed. Age, gender, family income, educational level, and diabetes were included in the final models because they were variables strongly associated with periodontitis. All variables included in the final multivariate model were determined to be independent through the assessment of their co-linearity. Areas under the ROC curves (*receiver operating curves*), an estimate of the accuracy of the models, were also reported.

All analysis was performed using statistical software SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0 for Windows – SPSS Inc., Chicago, IL). Results were considered significant if $p < 0.05$ were attained.

RESULTS

Table 1 shows the distribution of variables of interest in study groups. The prevalence of alcohol consumption were of 45.2% (n=245). A high prevalence of smokers and former smokers in IA and DA groups was observed. Mean time of alcohol

consumption (years) increased along the groups, that is, MA<IA<DA, respectively 26.3 (± 9.7), 27.3 (± 10.4), 28.6 (± 9.7) ($p < 0.05$).

Periodontal variables were evaluated in all groups and are presented in table 2. Subjects from MA, IA, and DA showed higher plaque index values and mean number of sites with BOP, mean and percent of sites with PD ≥ 5 mm and CAL ≥ 5 mm when compared to subjects in NA group. These differences were significant among all pair of group comparisons, including DA *versus* IA, DA *versus* MA, DA *versus* NA, IA *versus* MA, IA *versus* MA, IA *versus* NA, and MA *versus* NA.

Subjects in all groups presented a high mean number of present teeth (23.8 ± 2.3). A total of 51,598 sites were examined totalling a mean of 95.2 sites per subject. In table 2, it can be observed that the average number of lost teeth in DA and IA groups was significantly higher than in NA and MA groups.

A total of 134 (24.7%) subjects were diagnosed with periodontitis (cases) according to the definition adopted in the present study (Table 3). The prevalence of periodontitis in the NA, MA, IA, and DA groups was of 17.2% (reference), 24.0% (crude OR=1.52, CI 1.07-2.65), 29.6% (crude OR=2.03, CI 1.15-3.57), and 53% (crude OR=4.72, CI 2.73-7.92), respectively. Therefore, the prevalence of periodontitis and alcohol OR estimates significantly increased with an increase of alcohol exposure (DA>IA> MA; $p < 0.05$).

In the univariate analysis, individuals that presented family income < 5 BMS, smokers and former smokers were significantly associated with occurrence of periodontitis ($p < 0.001$) (Table 3).

Significant variables and adjusted OR estimates for the occurrence of periodontitis in the final logistic models were: (1) Smokers: alcohol use (MA group: OR=3.43, CI 1.04-3.98; IA group: OR=5.48, CI 1.97-6.02; DA group: OR= 7.91, CI 2.96-12.18) and

lost teeth (OR=2.82, CI 1.07-5.78); (2) Former smokers: alcohol use (MA group: OR=2.82, CI 1.21-2.72; IA group: OR=3.75, CI 1.21-4.13; DA group: OR=4.12, CI 1.63-5.91) and lost teeth (OR=2.73, CI 1.02-3.82); (3) Non-Smokers: alcohol use (MA group: OR=1.22, CI 1.02-1.63; IA group: OR=2.17, CI 1.03-2.21; DA group: OR=3.02, CI 1.51-5.96) and lost teeth (OR=1.14, CI 1.01-1.98). These findings emphasize a strong interaction effect of smoking-alcohol use, since in all groups of alcohol users OR estimates for the occurrence of periodontitis were approximately two times higher in smokers compared with non-smokers (Table 4).

Gender, age, plaque index, BMI, diabetes, educational level, family income <5BMS, cohabitation status, and last dental visit were not variables significantly associated with periodontitis in multivariate regression models (Table 4).

DISCUSSION

The present study investigated the association between the frequency of alcohol consumption and periodontitis and confirmed the hypothesis that higher alcohol consumption was associated with prevalence and severity of periodontitis. It is noteworthy that these findings were still more pronounced in smokers. Conflicting findings regarding the association between alcohol consumption and periodontitis were reported in the literature, being that some studies reported a positive association (Novacek et al. 1995, Enberg et al. 2001, Khocht et al. 2003, Amaral et al. 2008 e 2009, Konstad et al. 2008) while others reported no association (Torrunguang et al. 2005, Bouchard et al. 2006, Jansson 2008). To our knowledge, few studies investigated the association between alcohol dependence and periodontal disease (Novacek et al. 1995, Enberg et al. 2001, Khocht et al. 2003, Amaral et al. 2008).

Biological mechanisms explaining the effects of alcohol in periodontal tissues has been discussed (Tezal et al. 2001; Pitiphat et al. 2003). Alcohol can affect the host response; impair neutrophil, macrophage, and T-cell functions; as well as increase the frequency of infections. Furthermore, it has toxic effects on the liver and interferes with protein metabolism. Ethanol stimulates bone resorption *in vitro*, suppresses bone turnover, and may have a direct toxic effect on periodontal tissues (Tezal et al. 2001). Excessive and constant alcohol use may affect the host response to infections caused by bacteria, thus increasing host vulnerability (Amaral et al. 2008).

Prevalence rates of periodontitis in the present study were high (17.2% to 53%), as well as alcohol consumption OR estimates for the occurrence of periodontitis. Similar (Sakki et al. 1995, Tezal et al. 2001, Tezal et al. 2004, Amaral et al. 2008) and different (Shimazaki et al. 2005, Bouchard et al. 2006, Jansson 2008) results were reported. In the present study, findings reinforce the effect of the frequency of alcohol consumption in the occurrence of periodontitis.

It is important to highlight that methodological issues may have significantly influenced the conflicting results of the association between alcohol and periodontitis presented in the literature. Some studies presented small samples and great variability in the definition of alcohol dose-exposure, including different cut-off points for the amount and frequency of alcohol consumption (Torrunguang et al. 2005; Bouchard et al. 2006; Jansson, 2008), while others presented less robust definitions of periodontitis (Shizukuishi et al. 1998; Okomoto et al. 2006).

Methods of measurement of alcohol exposure levels and dependence are complex and prone to information biases. However, the use of AUDIT and CAGE questionnaires can minimize these biases. AUDIT was developed under the supervision of WHO and it is composed by 10 questions (3 questions about the

consumption of alcoholic beverages, 4 questions about alcoholic beverages dependence, and 3 questions about problems related to alcoholic beverages (Saunders et al.1993). CAGE is validated in Brazil and it is composed by 4 questions. CAGE presents a specificity of 83% and a sensitivity of 88% when the cut-off point of 2 positive answers is adopted to define alcoholic beverages (Masur & Monteiro1983, Amaral et al. 2008).

Sample of the present study comprised a large number of subjects in a group age of 35-55 years. Some studies demonstrated age as risk indicator associated to periodontitis (Amaral et al. 2008; Do et al. 2003). In this manner, the strategy of age restriction in the sample of the present study could reduce the variance of measurements and minimize the impact of age as a confounder in the association with other variables of interest. Nevertheless, age was not associated with periodontitis in the final logistic models.

Periodontitis case definition adopted in the present study can be considered robust. This definition was used to avoid underestimation of periodontitis prevalence. It has been recommend to be used in association studies (López et al. 2002). In addition to the higher prevalence of periodontitis observed among alcohol users groups, worse periodontal parameters BOP, PD, and CAL were also observed in these subjects. These findings were also reported in previous studies (Tezal et al. 2001 and 2004; Amaral et al. 2008 and 2009; Kongstad et al. 2008).

Results from the present study showed a high plaque index, varying from ~50% to 65%, among subjects in the global sample. However, dental biofilm considered to be a primary etiological factor for periodontitis (Davenport et al. 1998; Albandar & Rams, 2002, Costa et al. 2009) was not a significant variable in the final multivariate model. Hence, it can be rationalized that dental biofilm is a necessary factor for the

development of periodontal diseases, but variations in biofilm accumulation during a period of time has a less important role in the variation of periodontitis pathogenesis (Grossi et al. 1994). Similar findings were also reported when the effect of the variable plaque index was controlled in association studies between alcohol use and periodontitis (Novacek et al. 1995, Tezal et al. 2001, Amaral et al. 2008).

Periodontitis has been pointed as the main cause of tooth mortality after 45 years of age (Costa et al. 2009) and it has been associated to strong negative impacts in the quality of life of periodontally susceptible subjects. Therefore, the number of lost teeth has been considered a strong risk indicator for periodontitis (Copeland et al. 2004, Costa et al. 2011). The mean number of lost teeth was low in the present study. It is important to emphasize that the inclusion criteria of having a minimum of 14 teeth could have influenced these results. However, this variable was significantly associated with the occurrence of periodontitis in all groups of alcohol users, especially in smokers (OR=2.82; CI 1.07-5.78).

Prevalence of alcohol users were lower among females. A low alcohol consumption rate among Brazilian women due to social and behavioural reasons was reported (Amaral et al. 2008). However, an increase in alcoholic beverage drinking among women, especially among those with young ages, was also reported (Amaral et al. 2009). Gender as a variable not significant in the multivariate final models reinforces the strength of the association between alcohol use and periodontitis when explanatory factors and confounders are controlled. Similar findings were also reported by Do et al. 2003 in a sample of the Vietnam population.

A great number of studies have demonstrated that smoking is strongly related to the risk of periodontal attachment loss, as well as bone and tooth loss (Labriola et al. 2005; Heasman et al. 2006). Moreover, studies showed incremental odds ratio

estimates for the occurrence of periodontitis when smoking dose-exposure was evaluated (Grossi et al. 1994; Tomar e Asma, 2000; Torrungrung et al. 2005). Studies have reported a high prevalence of smokers among alcohol users (Tezal et al. 2001 and 2004; Amaral et al. 2008; Kongstad et al. 2008). Findings from the present study confirmed this statement showing a higher prevalence of smokers and a strong association between smoking and periodontitis. It was also demonstrated in the present study that the association between periodontitis and alcohol use was independent of smoking (non-smokers OR ranged from 1.22 to 3.02). Similar findings were also reported (Copeland et al. 2004; Tezal et al. 2001, 2004; Torrungruang et al. 2005; Amaral et al. 2008; Shizukuishi et al. 2008).

The interactions between alcohol consumption frequency and smoking in the occurrence of periodontitis showed higher OR estimates, especially for current smokers in the DA group. However, all groups of alcohol users odds ratio estimates for the occurrence of periodontitis were approximately two times higher in smokers (OR=3.43 to 7.91) compared to non-smokers (OR=1.22 to 3.02). Thus, these results of smoking-alcohol interaction can be explained by a potentiated effect of risk variables that affect the immune response and strongly influence the host susceptibility. In addition, the effect of smoking-alcohol interaction in the occurrence of periodontitis also emphasizes the influence of behavioral factors in the pathogenesis of periodontitis. By contrast, in a cross-sectional study by Tezal et al 2001, no significant interaction was found implying that the relationship between alcohol consumption and periodontal disease changes with smoking. However, these authors reinforced the need of evaluating interaction in such association studies.

Studies on the association between periodontitis and some risk indicators such as diabetes, body mass index, family income, educational level, and frequency of dental

visits are reported in dental literature with conflicting findings (Albandar & Rans 2002; Bouchard et al. 2006; Naoki et al. 2008, Costa et al. 2011). In the present study, these risk indicators were not significantly associated with the occurrence of periodontitis in the multivariate final logistic models. Although controversial, socioeconomic and cultural status can have an effect on subjects' behaviour and facilitate the incorporation of noxious behavioural habits in relation to general health (Coulson et al. 2010, Casswell 2011).

Some limitations of the present should be pointed out. Although significant and well founded, the sample cannot be considered representative of the Brazilian population. Moreover, the cross sectional design do not allow temporal inferences regarding the abusive alcohol use and periodontitis. In this manner, further studies with representative samples and prospective design are required.

The present study provided some evidence of the high frequency of alcohol consumption as a risk indicator for periodontitis. Preventive and educational strategies within general health services should give attention to the hazardous effects of alcohol consumption in periodontal status. It was concluded that the prevalence of periodontitis among alcohol users was high and that the frequency of alcohol consumption and alcohol dependence increased the odds of periodontitis incrementally mainly in smokers.

REFERENCES

1. Albandar, J.M. & Rams, T.E. (2002) Global epidemiology of periodontal disease: an overview. *Periodontology 2000* **29**, 7-10.
2. Albandar, J.M. (2002) Periodontal diseases in North America. *Periodontology 2000* **29**, 31-69.
3. Amaral, C.S., Luiz, R.R & Leão, A. (2008) The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *Journal of Periodontology* **79**, 993-998.
4. Amaral, C.S., Vettore, M.V. & Leão, A. (2009) The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dentistry* **37**, 643-651.
5. American Diabetes Association (2005) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. *Diabetes Care* 2005;1(suppl.1):37-42.
6. Bouchard, P., Boutouyrie, P., Mattout, C., Bourgeois D. (2006) Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of Periodontology* **77**,479–89.
7. Casswell S. (2011). Health and societal effects of alcohol. *Lancet* **5**;377(9764):463-464.
8. Coulson, C.E., Williams, L.J., Henry, M.J., Berk, M., Lubman, D.I., Brennan, S.L., Nicholson, G.C., Kotowicz, M.A., Korn, S. & Pasco, J.A. (2010) Patterns of alcohol use and associated physical and lifestyle characteristics according to new Australian guidelines. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* **44**,946-951.
9. Copeland, L. B., Krall, E. A., Brown, L. J., Garcia, R. I. & Streckfus, C. F. (2004). Predictors of tooth loss in two US adult populations. *Journal of Public Health Dentistry* **64**, 31–37.

10. Costa, F.O., Guimarães, A.N., Cota, L.O. M., Pataro, A.L., Takeshi, K.S., Cortelli, S.C. & COSTA, J. E. (2009) Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *Journal of Oral Science* **51**, 199-206.
11. Costa, F.O., Cota, L. O.M., Lages, E.J.P., Lorentz, T.C.M., Oliveira, A. M.S.D., Oliveira, P.A.D. & Costa, J. E. (2011) Progression of periodontitis in a sample of regular and irregular compliers under maintenance therapy: A 3-year follow-up study. *Journal of Periodontology*. [Epub ahead of print]
12. Davenport, E.S., Williams, C.E., Sterne, J.A., Sivapathasundram, V., Fearne, J.M. & Curtis, M.A. (1998) The east London study of maternal chronic periodontal disease and preterm low birth weight infants: study design and prevalence data. *Annals of Periodontology* **3**, 213-221.
13. Do, G.L., Spencer, A.J., Roberts-Thomson, K., Ha, H.D. (2003) Smoking as a risk indicator for periodontal disease in the middle-aged Vietnamese population. *Community Dentistry of Oral epidemiology* **31**, 437-446.
14. Enberg, N., Wolf, J., Ainamo A., Alho, H., Heinälä, P. & Lenander-Lumikari, M. (2001) Dental diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: A radiological study. *Acta odontologica Scandinavica* **59**, 341-347.
15. Ewing, J.A. (1984) 'Detecting Alcoholism: The CAGE Questionnaire. *Journal of the American Medical Association* **252**: 1905-1907.
16. Grossi, S.G., Zambon, J.J., Ho, A.W., Koch, G., Dunford, R.G., Machtei, E.E., Norderyd, O.M. & Genco, R.J. (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* **65**, 260-267.
17. Harris, C.K., Warnakulasuriya, K.A., Johnson, N.W., Gelbier, S. & Peters, T.J. (1996) Oral health in alcohol misusers. *Community Dental Health* **13**, 199-203.

18. Heasman, L., Stacey, F., Preshaw, P.M., McCracken, G.I., Hepburn, S. & Heasman, P.A. (2006) The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 241-253.
19. Jansson, L. (2008) Association between alcohol consumptions and dental health. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 379-384.
20. Khocht, A., Janal, M., Schleifer, S. & Keller, S. (2003) The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. *Journal of Periodontology* **74**, 485-493.
21. Kongstad, J., Hvidtfeldt, U.A., Gronbaek, M., Stoltze, K. & Holmstrup, P. (2008) Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 1032-1039.
22. Labriola, A., Needleman, I. & Moles, D.R. (2005) Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000* **37**, 124-137.
23. Lopez, N. J., Smith, P. C. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **8**, 911-924.
24. Mayfield, D., McLeod, G., Hall, P. (1974) The CAGE questionnaire: Validation of a new alcoholism screening instrument. *American Journal of Psychiatry* **131**, 1121-1123.
25. Masur, J. & Monteiro, M.G. (1983) Validation of the "CAGE" alcoholism screening test in a Brazilian psychiatric inpatient hospital setting. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **16**, 215-218.

26. Mendoza-Sassi, R.A. & Béria, J.U. (2003) Prevalence of alcohol use disorders and associated factors: A population-based study using AUDIT in southern Brazil. *Addiction* **98**, 799-804.
27. Naoki, N., Morita, M., Kawanami, M. (2008) Oral health Care-specific self-efficacy assessment predicts patients' completion of periodontal treatment: a pilot study. *Journal of Periodontology* **79**:1041-1047.
28. Nishida, N., Tanaka, M., Hayashi, N., Nagata, H., Takeshita, T., Nakayama, K., Morimoto, K. & Shizukuishi, S. (2004) Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *Journal of Dental Research* **83**, 161-165.
29. Novacek, G., Plachetzky, U., Pötzi R, Lentner, S., Slavicek, R., Gangl, A. & Ferenci, P. (1995) Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis – Role of etiology of liver disease. *Journal of Hepatology* **22**, 576-582.
30. Okomoto, Y., Tsuboi, S., Suzuki, S., Nakagaki, H., Ogura, Y., Maeda, K. & Tokudome, S. (2006) Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males. *Journal of Periodontal Research* **41**, 560-566.
31. Pitiphat, W., Merchant, A.T., Rimm, E.B. & Joshipura, K.J. (2003) Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Dental Research* **82**, 509-513.
32. Sakki, T.K., Kunuuttila, M.L., Vimpari, S.S. & Hartkainen, M.S. (1995) Association of lifestyle with periodontal health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **23**, 155-158.

33. Sarfati, A., Bourgeois, D., Katsahian A, S., Mora. F. & Bouchard, P. (2010) Risk assessment for buccal gingival recession defects in an adult population. *Journal of Periodontology* **81**, 1419-1425.
34. Saunders, J.B., Aasland, O.G., Babor, T.F., de la Fuente, J.R. & Grant, M. (1993) Development of the alcohol use disorders identification test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption – II. *Addiction* **88**, 791-804.
35. Shimazaki, Y., Saito, T., Kiyohara, Y., Kato, I., Kubo, M., Iida, M. & Yamashita, Y. (2005) Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama study. *Journal of Periodontology* **76**, 1534-1541.
36. Silness, J. & Løe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.
37. Shizukuishi, S., Hayashi, N., Tamagawa, H., Hanioka, T., Maruyama, S., Takeshita, T., Morimoto K. (1998) Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. *Annals of Periodontology* **3**: 303–11.
38. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2001) The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *Journal of Periodontology* **72**, 183-189.
39. Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W. & Genco, R.J. (2004) Alcohol consumption and periodontal disease. The third national health and nutrition examination survey. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 484-488.
40. Tomar, S.L. & Asma, S. (2000) Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Periodontology* **71**, 743-751.

41. Torrungruang, K., Tamsailom, S., Rojanasomsith, K., Sutdhibhisal, S., Nisapakulon, K., Vanichjakvong, O., Prapakamol S, Premsirinirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Unkurapinun N, Sritara P.(2005). Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. *Journal of Periodontology* **76**,558–65.

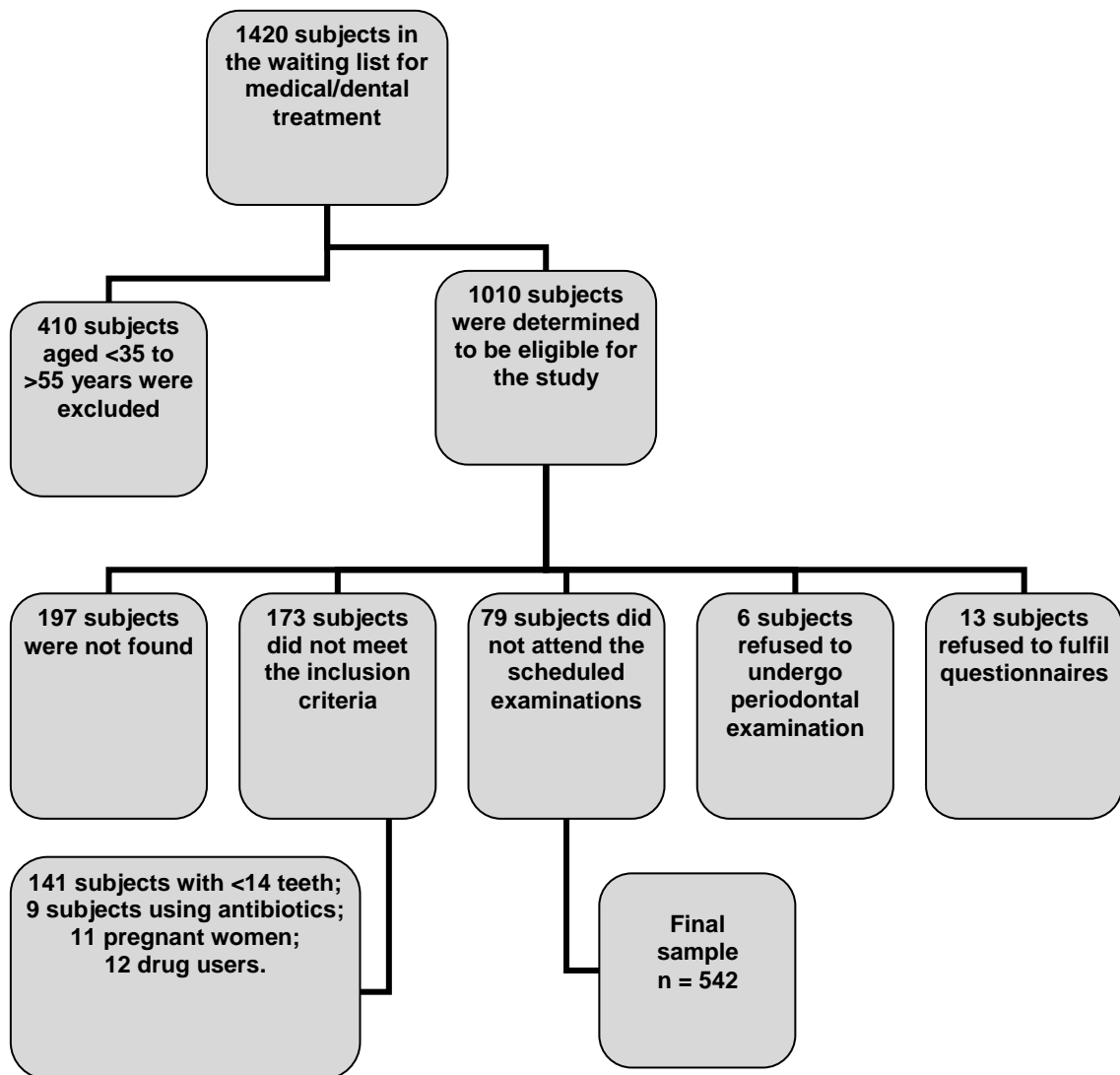


Figure 01. Sampling strategy flow.

Table 1. Characteristics of alcohol consumption groups.

Alcohol consumption	No/occasional alcohol use (NA)	Moderate alcohol use (MA)	Intensive alcohol use (IA)	Alcohol dependence (DA)	Total sample
Total	n = 297 (54.8%)	n = 96 (17.7%)	n = 81 (15%)	n = 68 (12.5%)	n = 542
Gender*					
Women	262 (90%)	19 (6.4%)	6 (2%)	5 (1.6%)	292
Men	41(16.5%)	50 (19.8%)	87 (34.9%)	72 (28.8%)	250
Age					
≥ 35-45 years	153 (61.3%)	28 (11.3%)	38 (15.2%)	31 (12.2%)	250
> 45-55 years	155 (53.1%)	40(13.8%)	48 (16.3%)	49 (16.8%)	292
Family income*					
< 5 BMS	141 (61.6%)	24 (10.3%)	36 (15.6%)	29 (12.5%)	230
≥ 5 BMS	132 (42.4%)	67 (21.3%)	88 (28.2%)	25 (8.1%)	312
Educational level					
< 8 years	120 (38.7%)	87 (28.1%)	64 (20.6%)	39 (12.6%)	310
≥ 8 years	78 (33.5%)	74 (32.1%)	52(22.4%)	28 (12.1%)	232
Co-habitation status*					
With companion (family/friends)	119 (32.0%)	105 (28.3%)	94 (25.2%)	54 (14.5%)	372
Without companion	52 (30.6%)	40 (23.4%)	35 (20.7%)	43 (25.3%)	170
Body Mass Index*					
≤25 Kg/m ²	103 (61.6%)	21(12.7%)	25 (14.9%)	18(10.8%)	167
> 25 Kg/m ²	211 (56.3%)	6 (16.4%)	58 (15.6%)	44 (11.7%)	375
Last Dental Visits					
Last 2 years	102 (52.2%)	41 (21.2%)	30 (15.4%)	22 (11.2%)	195
2-5 years	62 (54.4%)	19 (16.7%)	18 (16.1%)	15 (12.8%)	114
> 5 years	117 (50.2%)	41 (17.8%)	43 (18.3%)	32 (13.7%)	233
Diabetes*					
Yes	15 (46.8%)	6 (18.8%)	6 (18.8%)	5 (15.6%)	32
No	282 (55.3%)	90 (17.6%)	75 (14.7%)	63 (12.4%)	510
Smoking status*					
Non-smokers	112 (43.6%)	49 (18.8%)	74 (28.7%)	23 (8.9%)	258
Former smokers	21 (17.0%)	25 (19.6%)	41 (32.8%)	38 (30.6%)	125
Smokers	35 (21.9%)	19 (12.2%)	38 (23.6%)	67 (42.3%)	159
Mean alcohol use time (years)[†]	NA	26.3 (±9.7)	27.3 (±10.4)	28.6 (±9.7)	28.3 (±10.5)

*Chi-square test ($p < 0.001$); [†]ANOVA ($p < 0.05$); NA= not applicable; BMS= Brazilian minimum salary (approximately \$258.00 Euros)

Table 2. Periodontal variables according to alcohol consumption groups.

Alcohol consumption	No/occasional alcohol use (NA)	Moderate alcohol use (MA)	Intensive alcohol use (IA)	Alcohol Dependence (DA)
Plaque Score (%) [*]	52.2 ±21.24	58.3 ±22.6	61.4 ±23.7	64.9 ±23.9
Mean BOP [†]	10.3 ±13.2	12.3 ±8.9	12.9 ±11.3	14.2 ±13.8
Mean PD (mm) [†]	2.5 ±0.7	2.7 ±0.6	2.9 ±0.8	3.1 ± 0.9
Mean CAL (mm) [†]	2.9 ±0.5	3.1 ±1.3	3.3 ±1.7	3.8 ±1.2
Sites with PD ≥ 5 mm (%) [†]	4.2 ±7.8	6.5 ±10.4	7.3 ±9.9	9.6 ±12.8
Sites with CAL ≥ 5 mm (%) [†]	11.2 ±13.9	15.2 ± 19.7	19.3 ±21.2	25.8 ±24.7
Lost Teeth [†]	1.68±2.81	1.75 ± 3.27	2.04 ± 3.30	2.53 ± 3.21

^{*}Significant differences between alcohol groups at p<0.05, using ANOVA and Bonferroni post hoc analysis.

[†]Significant differences between alcohol groups at p<0.001, using Welch test and Tamhane post hoc analysis.

BOP = bleeding on probing; PD = probing depth; CAL = clinical attachment level.

Table 3. Distribution of independent variables by periodontitis status

Variables	Periodontitis cases (n = 134)		Periodontitis non cases (n = 408)		Crude OR (95% CI)	P*
	N	%	n	%		
Alcohol Status						
No/occasional (NA)	51	17.2%	246	82.8%	-	-
Moderate (MA)	23	24.0%	73	76.0%	1.52 (1.07-2.65)	0.042
Intensive (IA)	24	29.6%	57	70.4%	2.03 (1.15-3.57)	0.012
Alcohol dependence (DA)	36	53.0%	32	47.0%	4.72 (2.73-7.92)	<0.001
Gender						
Male	56	19.2%	236	80.8%	0.51 (0.38-0.77)	0.001
Female	78	31.2%	172	68.8%		
Age						
≥ 35-45 years	64	25.6%	186	74.4%	1.09 (0.88-1.93)	0.663
≥45-55 years	70	24.0%	222	76.0%		
Family income						
<5 BSM	60	26.1%	170	73.9%	1.99 (1.29-3.05)	<0.001
≥5 BSM	47	15.1%	265	84.9%		
Educational level						
<8 years	84	27.1%	226	72.9%	1.35 (0.96-2.12)	0.069
≥8 years	50	21.6%	182	78.4%		
Co-habitation status						
Without companion	64	37.6%	106	62.4%	2.60 (0.73-3.9)	<0.001
With companion	70	18.8%	302	81.2%		
Body Mass Index						
≤ 25 Kg/m ²	55	33%	112	67.0%	0.54 (0.36-0.81)	0.002
>25 Kg/m ²	79	21.1%	296	78.9%		
Last dental visit						
Last 2 years	32	16.4%	163	83.6%	-	-
2-5 years	24	21.1%	90	78.9%	1.36 (0.75-2.44)	0.156
> 5 years	78	33.5%	155	66.5%	1.34 (0.85-2.11)	0.101
Diabetes (Yes)	9	28.2%	23	71.8%	1.02 (0.54-2.67)	0.318
Smoking						
Non-smokers	21	12.9%	237	87.1%	-	-
Former smokers	29	23.8%	96	74.2%	3.49 (1.85-6.27)	<0.001
Smokers	56	35.2%	103	64.8%	6.15 (3.53-10.61)	<0.001

*Chi-square test.

Table 4. Final logistic regression models for periodontitis by smoking status

Variables	Smokers (n =159)*			Former smokers (n =125)**			Non-Smokers (n =258)***		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Alcohol Use									
Moderate (MA)	3.43	1.04-3.98	<0.001	2.82	1.21-2.72	0.028	1.22	1.02-1.63	0.032
Intensive (IA)	5.48	1.97-6.02	<0.001	3.75	1.21-4.13	0.012	2.17	1.03-2.21	0.031
Alcohol dependence (DA)	7.91	2.96-12.18	<0.001	4.12	1.63-5.91	<0.001	3.02	1.51-5.96	0.026
Age									
≥45-55 years	1.24	0.91-2.63	0.071	1.42	0.71-1.96	0.132	0.93	0.52-1.79	0.163
Gender*									
Male	1.56	0.38-2.72	0.283	1.27	0.41-2.12	0.285	1.02	0.23-1.92	0.452
Family income*									
<5 BSM	1.73	0.78-3.23	0.042	0.96	0.74-3.21	0.062	1.01	0.91-2.13	0.067
Educational level[†]									
<8 years	0.96	0.18-3.71	0.078	0.85	0.23-2.91	0.083	0.627	0.14-2.02	0.074
Diabetes (Yes)									
Diabetes (Yes)	1.14	0.92-3.96	0.061	0.83	0.23-3.18	0.382	0.94	0.25-3.21	0.071
Lost Teeth									
Lost Teeth	2.82	1.07-5.78	<0.001	2.73	1.02-3.82	<0.001	1.14	1.01-1.98	0.022

Statistically significant are show in bold

Dependent variable: occurrence of periodontitis

Area under ROC curve for the model: *0.756; **0.719; ***0.703