

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**COMPARAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE
INDIVÍDUOS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO
CRACK**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maísa Casarin

Santa Maria, RS, Brasil

2015

COMPARAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO CRACK

Maísa Casarin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontologia, ênfase em Periodontia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Batistin Zanatta

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

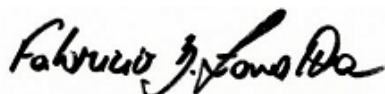
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**COMPARAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS
E NÃO EXPOSTOS AO CRACK**

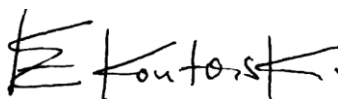
elaborada por
Maísa Casarin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas – ênfase Periodontia

COMISSÃO EXAMINADORA:



Fabricio Batistin Zanatta, Profº Drº.
(Presidente/Orientador)



Karla Zanini Kantorski, Profª Drª. (UFSM)



Rafael Guerra Lund, Profº Drº. (UFPEL)

Santa Maria, 07 de julho de 2015

Dedicatória

Àqueles que mais amo nessa vida, Odir José, Maria Lêda e Fernando.

Agradecimentos Especiais

À meu orientador, **Fabricio Batistin Zanatta**

Obrigada por me permitir conviver e aprender contigo durante esse tempo. Obrigada por me estimular a procurar respostas ao invés de me fornecê-las imediatamente quando as lhe solicitava, por valorizar cada oportunidade que surgiu nesse período. Teu profissionalismo é admirável, tens o dom de ensinar e incentivar. A tua dedicação como docente serve de exemplo para mim. A você, todo meu respeito e admiração.

À minha amada orientadora de Graduação e da vida, **Raquel Pippi Antoniazzi**

Obrigada por ter confiado em mim, parte de sua tese. Pelos ensinamentos, me mostrar a parte clínica da periodontia. Saiba que seu exemplo de mulher e profissional me guiará frente aos desafios que ainda terei na vida. A você, toda a minha gratidão, admiração e reconhecimento.

À meu coorientador, **Rodrigo de Almeida Vaucher**

Obrigada pela paciência durante essa jornada. Coorientar uma aluna de outra área certamente não deve ter sido fácil. Obrigada por dedicar seu tempo e compartilhar sua experiência para que minha formação fosse um aprendizado. Seu olhar crítico e construtivo me ajudou a superar os desafios deste trabalho. Serei eternamente grata.

Agradecimentos

À Deus, pela vida, saúde e pelas oportunidades.

À minha família

Meu pai, **Odir José Casarin** (in memoriam), meu maior exemplo. Obrigada por todo o ensinamento, dedicação e lição de vida. Certamente essa fase surgiu a partir de ti, dos teus sonhos, que acabaram se tornando os meus. Obrigada por sempre me ensinar que o que importa na vida não é o que possuímos, mas sim o que somos. Saudades...saudades...saudades...

Minha mãe, **Maria Lêda Casarin**, meu suporte, minha guerreira. Obrigada por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e apoiar minhas decisões. Obrigada pela dedicação e compreensão durante minhas ausências.

Meu irmão, **Fernando Casarin**, meu orgulho e porto seguro. Obrigada pelo incentivo, por me amparar nos momentos difíceis. Por muitas vezes assumir o papel de pai e pela ajuda constante. Que você continue assim, um homem de poucas palavras mas de grandes gestos.

Tenho um enorme orgulho de ter vocês como família. Só tenho a agradecer pela confiança, amor, carinho e dedicação que depositam em mim. Amo vocês infinitamente.

À **Mateus Rigon Moro**, que sempre me compreendeu e me apoiou, que me fez levantar nos momentos de fragilidade e seguir adiante, entendendo minhas ausências. Por me amar e me aceitar mesmo diante de todas as minhas fraquezas e defeitos. A sua presença me ilumina, me enaltece e faz com que eu me torne a cada dia uma pessoa melhor. Amo você.

A Meus tios, **Ari Testa** e **Roseli Testa**, por encontrar toda a força, carinho e serenidade necessários nesses longos anos. Pelos conselhos e pela disposição em ajudar. Minha vida fica mais leve e feliz com a presença de vocês.

À **Mirian Testa Bastiani** e **Eduardo Bastiani**, por me mostrarem o significado de amizade sincera e companheirismo. Por me falarem exatamente aquilo que preciso ouvir quando isto se faz necessário. Por estarem me proporcionando um momento certamente único em minha vida, renovando todas as energias que existem em mim, me fazendo acreditar na vida e no mais puro amor que possa existir. Que nossa **Carolina** enalteça ainda mais o amor de vocês e engrandeça nossa amizade, companheirismo e cumplicidade. **ELA** é certamente a grande mudança ocorrida em minha vida.

À **Michely E. Machado**, um dos presentes que o mestrado me deu. Inicialmente colega e hoje uma amiga amável que terei a honra de levar para sempre em minha vida. Tenho certeza que nossa ligação estava estabelecida a muito tempo. Muito obrigada por tudo!

À **Veronica Butzen**, da faculdade ao trabalho. Minha colega, amiga, irmã e muitas vezes mãe. Obrigada por tudo, desde a época de faculdade até os dias atuais. Obrigada por me deixar aprender contigo...por atender meus pacientes quando precisei me ausentar, enfim...por ser exatamente quem você é, e por estar presente na minha vida.

À **Danusa Begnini**, minha amiga e parceira de todos os momentos. Foi chegando de mansinho e me conquistou, me cativou. Obrigada pelo suporte durante a prova de mestrado...e em todo o decorrer do mesmo, pelos conselhos, conversas...enfim, por fazer minha vida mais leve desde que você chegou em minha casa.

Ao **grupo do Levantamento Epidemiológico de Rosário do Sul**, obrigada pelos momentos de descontração, conversas, pelo apoio e pelas risadas, certamente o peso desse trabalho se torna mais leve com vocês por perto.

À **Jociana Boligon**, pelo apoio, conselhos, por sempre ter muita clareza e serenidade durante nosso convívio (assim ó: tudo de tudo). Que nossa amizade apenas cresça durante todo esse tempo, e que ela nunca se perca. Te admiro muito.

À todo o **grupo da Periodontia**, obrigada pelos momentos agradáveis que

passamos juntos, pelos ensinamentos, pelo apoio que damos uns aos outros, pelas conversas e amizades que levaremos para a vida toda.

À **Alessandra Pascotini Grellman**, pela risada inconfundível, pelos momentos de descontração, por estar sempre a disposição. Que nossos caminhos continuem se encontrando sempre.

À equipe e **família Oral Sin**, por me proporcionarem aprender todos os dias com vocês. Que possamos continuar atendendo nossos pacientes com muito carinho, qualidade e excelência. Que tenhamos habilidade de crescer juntos, sempre.

À **Luiz Felipe Durand** e **Simone Pippi Antoniazzi**, obrigada pela oportunidade de me deixar fazer aquilo que mais gosto: exercer a odontologia. Certamente esses 2 últimos anos, foram muito engrandecidos pela confiança depositada em mim, e em meus tratamentos. Que nossa parceria perdure por muitos e muitos anos. Se hoje me sinto muito mais segura, certamente foi pela oportunidade concedida. Muito obrigada!

À **professor Paulo Bayard Dias Gonçalves**, por nos conceder livre acesso ao laboratório do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, BIOREP, permitindo a finalização desse trabalho. A todos os seus orientados, Victor, Werner, Monique, Juliane e Andi, aos professor do laboratório e demais alunos, pela ajuda constante durante todos os dias e pelas dúvidas sanadas. Obrigada!

Aos amigos do laboratório de microbiologia da UNIFRA, 115, **Leandro, Marcos, Vivi** e **Vitinho**, pelo companheirismo e pela ajuda durante toda a pesquisa, certamente esse trabalho não teria sido finalizado sem a ajuda de vocês. Levarei comigo todos os ensinamentos adquiridos e a certeza de que realmente existem pessoas boas no mundo, e dispostas a ajudar. Contem comigo sempre!

À Professora **Michele Roratto Sagrillo**, obrigada pelas palavras de conforto e apoio. Por acreditar que esse trabalho daria certo. Por abrir as portas de seu laboratório sempre que precisei. Muito obrigada!

À FIOCRUZ, que nos cedeu as ATCCs para que esse trabalho pudesse ocorrer.

Ao governo do Estado do Rio Grande do Sul, por intermédio da Fundação de Amparo à pesquisa do Rio grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio Financeiro neste trabalho.

À minha banca examinadora, que da melhor forma possível contribuirá para aprimoração desse trabalho. Meu respeito e sincero agradecimento.

À UNIFRA, em especial ao laboratório de microbiologia, genética e biologia molecular, pelo espaço cedido para a realização desse trabalho.

À todos os professor da UNIFRA – pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, amizade e respeito. Obrigada por toda a dedicação durante minha graduação e nesses últimos anos, pois cada um, com sua particularidade me levou a certeza de ter escolhido a profissão certa e a amar a odontologia.

Aos professores Carlos Heitor Cunha Moreira, Karla Zanini Kantorski e Thiago Ardenghi, pelo exemplo de profissionalismo e seriedade como professores e pesquisadores.

À Funcionária Jéssica Dalcin da Silva, por sua total disponibilidade, competência e agilidade na resolução dos mais diversos assuntos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Santa Maria e professores do programa, pela oportunidade de realizar o mestrado e pelo aprendizado.

Aos voluntários que participaram da pesquisa, muito obrigada pela colaboração. Vocês tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPARAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS E NÃO

EXPOSTOS AO CRACK:

AUTORA: MAÍSA CASARIN

ORIENTADOR: FABRÍCIO BATISTIN ZANATTA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de Julho de 2015.

Inúmeros indicadores de risco têm se mostrado poder modular o estabelecimento e progressão da doença periodontal. Há evidências demonstrando que algumas drogas ilícitas como a cocaína e heroína podem influenciar na etiopatogenia da periodontite. Entretanto, há poucas evidências investigando a influência do crack na epidemiologia e perfil de periodontopatógenos na periodontite. O objetivo deste estudo transversal com grupo controle foi comparar a contagem de alguns periodontopatógenos em indivíduos expostos ao *crack* a sujeitos controles pareados por idade, sexo e exposição ao tabaco. Foram coletadas variáveis demográficas, clínicas e biofilme subgengival de 155 sujeitos (74 expostos ao crack /81 controles). O desfecho microbiológico foi a contagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) mensuradas pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que os expostos apresentaram maior severidade na perda de inserção ($P=0.000$), analisado por McNemar, com excessão de sangramento gengival marginal ($P=0,489$) e cálculo supragengival ($P=0,504$), teste Wilcoxon. Não foram observadas diferenças significativas na prevalência da contagem 10^6 células/ml e na contagem total das bactérias avaliadas entre os grupos, através de Regressão de Poisson com Variância Robusta. Na análise dos sujeitos que tiveram apenas as maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$), tanto na análise bruta quanto na ajustada houve uma prevalência significativamente maior de indivíduos no grupo exposto ao crack. Conclui-se que o perfil microbiológico de Aa, Pg, Pi e Fn não diferiu entre expostos e não expostos ao crack.

Palavras-chave: Cocaína/crack. Microrganismos. Periodontite. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Usuários de Drogas.

ABSTRACT

Masters Dissertation

Dentistry Sciences Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria

MICROBIOLOGICAL COMPARISON OF INDIVIDUALS EXPOSED AND UNEXPOSED TO THE CRACK

AUTHOR: MAÍSA CASARIN

TUTOR: FABRICIO BATISTIN ZANATTA

Place and date of Defense: Santa Maria, 2015, July 07th.

Several risk factors have been shown to be able to adjust the establishment and progression of periodontal disease. There is evidence demonstrating that some illegal drugs like cocaine and heroin can influence the pathogenesis of periodontitis. However, there is little evidence investigating the influence of crack in epidemiology and periodontal profile in periodontitis. The aim of this cross-sectional study with a control group was to compare the count of some periodontal pathogens in individuals exposed to crack the control subjects matched for age, sex and exposure to tobacco. Demographic variables were collected, clinics and subgingival biofilm of 155 subjects (74 exposed to crack / 81 controls). The microbiological outcome was count *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Fusobacterium nucleatum* (Fn) measured by real time PCR. The results demonstrated that exposure presented in greatest severity insertion loss ($P = 0.000$), analyzed by McNemar with the exception of marginal gingival bleeding ($P = 0.489$) and supragingival calculus ($P = 0.504$), Wilcoxon. No significant differences were observed in the prevalence of counting 10^6 cells / ml and the total count of bacteria evaluated between groups through Poisson regression with Variance Robusta. In the analysis of subjects who had only the highest bacterial counts ($\geq 75\%$), both in gross nor adjusted analysis, there was a significantly higher prevalence of individuals in the group exposed to crack. It is concluded that the microbiological profile of Aa, Pg, Pi and Fn did not differ between exposed and unexposed to crack.

Keywords: Crack cocaine. Drug Users. Microorganism. Periodontitis. Real Time Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma dos usuários e não usuários de crack.	45
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da amostra de acordo com a exposição ao crack em indivíduos usuários e controles.	40
Tabela 2 – Distribuição do uso de crack de acordo com variáveis de interesse.	41
Tabela 4 - Razão de prevalência (RP) de contagens microbiológicas ($\geq 10^6$) e razão de média (RM) da contagem total de cada espécie bacteriana de acordo com a exposição ao Crack (n=155).	43
Tabela 5 - Razão de prevalência (RP) da contagem total de cada espécie bacteriana no quartil 75% de acordo com a exposição ao Crack (n=155).	44

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. ARTIGO	20
Resumo	22
Relevância Clínica	23
Introdução	24
Materiais e métodos	25
Participantes e delineamento do estudo	25
Critérios de elegibilidade	25
Tamanho da amostra	26
Coleta de dados	26
Coleta microbiológica	27
Processamento das amostras	27
Análise dos dados	29
Resultados	30
Discussão	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICES	53
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	53
Apêndice B – Ficha Clínica	55
Apêndice C – Estudos Utilizados para Realizar Cálculo Amostral	56
ANEXOS	61
Anexo A – Entrevista	61
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	67
Anexo C – Normas da Revista	70

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é resultante da inflamação nos tecidos de suporte dos dentes e, tem sido caracterizada, como uma doença infecciosa de progressão lenta (ARMITAGE 1999). Sua etiologia está associada ao acúmulo de biofilme dental polimicrobiano (PAGE; KORNMAN, 1997) Os microrganismos mais frequentemente associados à sua progressão são *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T.forsythia*) (GENCO, et al., 1996), *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*), *Streptococcus sanguis* (*S.sanguis*) (SOCRANSKY et al., 1998), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) (CORTELLI et al., 2005; SLOTS; TING, 1999, GENCO et al., 1996; ZAMBON 1985), *P.intermedia*, *Campylobacter rectus* (*C.rectus*) e *Treponema denticola* (*T.denticola*) (ALBANDAR; BROWN; LÖE, 1997; TAKEUCHI et al., 2003).

Evidências microbiológicas têm demonstrado que ambas as contagens de periodontopatógenos no biofilme supra e subgingival de indivíduos saudáveis apresentaram significativamente menores contagens totais de bactérias comparadas a indivíduos com periodontite. Apesar de altos níveis de *Actinomyces* em biofilmes supra e subgingivais de indivíduos saudáveis e doentes terem sido detectadas (XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000a), proporções mais elevadas de *P.gingivalis*, *T.forsythia*, espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Treponema* e *T.denticola* foram encontradas no biofilme subgingival de sujeitos com periodontite (XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000b). Assim, salienta-se que sujeitos portadores de periodontite apresentam uma contagem mais elevada de bactérias periodontopatógenas (NONNENMACHER et al., 2004).

A periodontite é uma doença dinâmica com padrões cíclicos de progressão e quiescência (GILTHORPE et al., 2003). Alguns fatores de risco, tal como tabagismo, pode modificar a resposta imune interferindo nas reações vasculares e imunológicas e comprometer o reparo dos tecidos periodontais, alterando esse ciclo de progressão (JOHNSON; HILL, 2004). Evidências clínicas relatam que fumantes apresentam maiores perdas de inserção, profundidades de sondagem e perdas dentárias quando comparados a sujeitos não fumantes (ALBANDAR et al., 2000;

JOHNSON; SLACH, 2001; TONETTI 1998).

Existem controvérsias sobre o efeito do fumo na microbiota. Algumas evidências não encontraram diferenças contagens de *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *T.forsythia*, *T.denticola* (DARBY et al., 2000), *Prevotella nigrescens* (*P.nigrescens*), *F.nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* (*P.micros*), *C.rectus*, *Eikenella corrodens* (*E.corrodens*), *Selenomonas noxia* (*S.noxia*), e *Streptococcus intermedius* (*S.intermedius*) (BOSTRÖM et al., 2001) entre fumantes e não fumantes. No entanto, uma maior prevalência do complexo laranja e vermelho incluindo *Eubacterium nodatum* (*E.nodatum*), *F.nucleatum* ss *vicentii*, *P.intermedia*, *P.micros*, *P.nigrescens*, *T.forsythia*, *P.gingivalis* e *T.denticola* foram encontradas em indivíduos fumantes comparados a não fumantes (EGGERT; MCLEOD; FLOWERDEW, 2001) e a ex-fumantes (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2001).

Tabagismo e Diabete Mellitus (SALVI; CAROLLO-BITTEL; LANG, 2008; TEEUW; GERDES; LOOS, 2010;), já encontram-se sedimentados como fatores de risco às doenças periodontais, outros indicadores têm sido investigados, tais como o estresse, depressão (GENCO et al., 1999), infecção por HIV (BARR; LOPEZ; RUADOBLES, 1992) fatores genéticos (MICHALOWICZ et al., 1991), obesidade (CHAFFEE; WESTON, 2010), osteoporose e osteopenia (HABASHNEH et al., 2010). Considerando a constante busca de outros indicadores de risco, na tentativa de diminuir a ocorrência e gravidade das doenças periodontais, as drogas ilícitas podem representar um possível papel na sua etiopatogenia.

O crescimento do consumo de crack vem chamando a atenção, tanto do poder público, quanto dos órgãos de saúde e sociedade em geral devido ao seu consequente impacto físico e emocional nos usuários bem como, pelas repercussões políticas, sanitárias e sociais. O crack é uma droga em forma sólida (“pedra”), obtida a partir da cocaína em pó, adicionada de água e de um agente alcalinizante (DUAILIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008; WOOD et al., 1996). A pedra é acondicionada em aparatos como latas de alumínio, cachimbos e tubos, onde é queimada com uma chama, transformando-se rapidamente do estado sólido para líquido e vapor (momento esse que estala, por isso a origem do nome “crack”), enquanto o usuário aspira a fumaça produzida (DUAILIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008; WOOD et al., 1996). O rápido efeito da droga, sensação mais forte que a apresentação em pó da cocaína, a não necessidade do uso de seringas, diminuindo

o risco de transmissão de doenças como AIDS e hepatite, além de seu baixo custo, estão entre as explicações pelo aumento na incidência de usuários desta droga (SCHEINMANN et al., 2007; WOOD et al., 1996;). Dentro de um curto período de tempo, os usuários crônicos podem desenvolver tolerância à euforia gerada pela droga, sentindo a necessidade do uso de doses cada vez maiores para que sintam o mesmo efeito. Esta crescente condição de dependência justifica também a preferência dos traficantes pelo produto (WOOD et al., 1996).

A plausibilidade biológica que sustenta uma potencial associação entre *crack* e cavidade bucal está nas características locais, como calor gerado, vasoconstrição, trauma mecânico quando o produto é friccionado na gengiva e diminuição do fluxo salivar, além dos efeitos deletérios na resposta imunológica de seus usuários (BALDWIN et al., 1997; CABRAL 2006; COLODEL et al., 2009; KAUSHIK; KAPILA; PRAHARAJ, 2011; MITCHELL-LEWIS et al., 1994, PARRY et al., 1996; PELLEGRINO; BAYER, 1998; SHEN; KENNEDY; OU, 1994; WOYCEICHOSKI et al., 2008). Ainda, uma diminuição da auto-estima, um descuido com a higiene e, por consequência, uma higiene bucal precária, além da pouca procura ao atendimento odontológico e do baixo nível socioeconômico dos usuários podem também explicar a associação (CEBRID 2005; FRIEDLANDER; MILLS, 1985; PARRY et al., 1996; SAYAGO, 2011; SCHEUTZ, 1984).

Algumas evidências verificaram as alterações no periodonto provocados pela cocaína/*crack* (COLODEL et al., 2009; KAPILA; KASHANI, 1997; YUKNA 1991). A ocorrência de doença periodontal, perda óssea radiográfica avançada, recessão, abrasão gengival e inflamação gengival foram descritas em uma série de 20 casos de usuários de cocaína atendidos em uma clínica privada, encaminhados pelas manifestações clínicas não usuais e falha na resposta ao tratamento periodontal (YUKNA 1991). Em um estudo transversal com 22 indivíduos usuários de drogas (2 de *crack* e 13 de cocaína) em fase de recuperação, todos apresentavam doença periodontal, apesar de não ter sido apresentada nenhuma descrição sobre como a doença foi diagnosticada (COLODEL et al., 2009). Em todos os estudos acima citados os indivíduos eram jovens e com bom controle de placa. Estudos mais antigos encontraram piores condições periodontais em indivíduos viciados em drogas ilícitas, porém alguns não descreveram o tipo de substância, ou quando descrita, era a heroína (ANGELILLO et al., 1991; PICOZZI et al., 1972; RIBEIRO et al., 2002; ROSENSTEIN 1975; SCHEUTZ 1984).

Invernici (2012) comparou as condições periodontais supra e subgingivais de 52 fumantes de *crack* e tabaco a fumantes apenas de tabaco e não fumantes. Não foram observadas diferenças significativas para todos os parâmetros avaliados quando comparados os grupos de tabaco, porém estes diferiram do grupo de não fumantes. Cabe ressaltar que a despeito do tempo do uso de *crack* ter sido alto (média de 6,9 anos), foram avaliados somente dentes índices (CPITN- Índice Comunitário de Necessidade de Tratamento Periodontal), o que pode ter subestimado a ocorrência da doença.

Infecções têm sido reconhecidas como uma das complicações mais graves de abuso de drogas (SCHEIDEGGER; ZIMMERLI, 1989). Fatores relacionados ao uso, como: utilizar seringas não esterilizadas, aparatos como latas de alumínio, cachimbos, tubos contaminados e drogas adulteradas, aumentam a exposição a patógenos microbianos (GORDON; LOWY, 2005). Um estudo comparou as condições microbiológicas de poliusuários de drogas, não encontrando diferenças entre usuários e não usuários, apesar dos sujeitos expostos terem apresentado piores condições periodontais quando comparados aos não expostos (MATEOS-MORENO et al., 2013). Ciesielski (2013) demonstrou que pacientes dependentes apresentaram maior ocorrência de *F.nucleatum*, *P.micros*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *S.sanguis*, *T.denticola*, *A.actinomycetemcomitans*, *C.rectus*, *E.corrodens*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* e *P.aeruginosa* em biofilme subgingival, através da detecção por PCR convencional, entretanto esse estudo apresenta algumas deficiências metodológicas, como a coleta de biofilme subgingival e supragingival, não ficando claro os sítios selecionados.

Para minimizar erros na detecção de microrganismos presentes na cavidade bucal, abordagens qualitativas e quantitativas podem ser aplicadas. Métodos de culturas, ensaios imunológicos, métodos enzimáticos (BANA), sondas de DNA (LOESCHE et al., 1992), técnicas de Checkerboard DNA-DNA hybridization (SOCRANSKY et al., 1998), Microarrays (PASTER et al., 2006), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção (KLEIN; GONÇALVEZ, 2003), multiplex (GARCÍA et al., 1998) e em tempo real (qPCR) (ATIEH 2008). Comparado com métodos de detecção convencionais, qPCR é considerado superior para detecção e quantificação de espécies pela sensibilidade e especificidade (LAU et al., 2004), simplicidade e rapidez (ATIEH 2008). Desse modo, justifica-se seu uso em estudos que busquem determinar o perfil da microbiota em sujeitos com doença periodontal

(LAU et al., 2004).

Apesar de existirem alguns estudos que verificaram o impacto da cocaína/*crack* na cavidade bucal (KAPILA; KASHANI, 1997), apenas dois estudos descreveram características da microbiota periodontal em usuários de drogas. Não há evidências consistentes de que a microbiota periodontal em usuários de *crack* difere de indivíduos não usuários. Assim, observa-se escassez de evidências quanto à identificação e quantificação de microrganismos na cavidade bucal de usuários de *crack*. Neste sentido, uma pesquisa nesta temática torna-se pertinente e importante.

Busca-se por meio desta metodologia testar a hipótese nula de não haver diferenças na prevalência de contagens de periodontopatógenos em indivíduos expostos ao *crack* comparados a controles, pareados quanto à idade, gênero e tabagismo. Nossa hipótese conceitual foi de que usuários de *crack* apresentariam maior prevalência de contagens de periodontopatógenos, comparados a não usuários.

O objetivo desse trabalho foi comparar a prevalência de contagens de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC-33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 49256) e *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), no biofilme subgengival de indivíduos expostos ao *crack* comparados a controles. Sendo os objetivos específicos, comparar a prevalência de contagens bacterianas $\geq 10^6$ células/ml, comparar a razão de média de contagem total de cada espécie bacteriana de acordo com a exposição ao *crack* e comparar prevalência dos sujeitos que tiveram apenas as maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$).

1. ARTIGO

Comparações microbiológicas de indivíduos expostos e não expostos ao crack

Periodontopatógenos em usuários de crack

Palavras-chaves: Cocaina/crack. Usuários de Drogas. Microrganismos. Periodontite. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Maísa Casarin¹, Raquel Pippi Antoniazzi², Rodrigo de Almeida Vaucher³, Carlos Alberto Feldens⁴, Fabricio Batistin Zanatta¹

¹ Divisão de Periodontia, Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

² Curso de Odontologia, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brasil.

³ Programa de Pós Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brasil.

Autor correspondente:

Maísa Casarin

- Rua Dr. Bozano, 587/503 - Centro - 97015-001 - Santa Maria - RS / Brasil

Telefone: +55-55-37431139

Email: maisa.66@hotmail.com

O artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Journal of Clinical Periodontology* (maio de 2015).

CONFLITO DE INTERESSE E FONTE DE FINANCIAMENTO

Os autores declaram não haver conflito de interesses. A pesquisa recebeu apoio financeiro do Estado do Rio Grande do Sul, por intermédio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Edital 003/2012, processo SPI 1655 12-4.

Resumo

Objetivos: Comparar a contagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* em indivíduos expostos ao crack à sujeitos controles pareados por idade, sexo e exposição ao tabaco.

Materiais e métodos: Este estudo transversal com grupo controle incluiu 155 sujeitos (74 expostos ao crack /81 não expostos). Foram coletadas variáveis demográficas, clínicas e biofilme de 4 sítios com maior profundidade de sondagem (PS) para análise em PCR em tempo real.

Resultados: Expostos apresentaram maior severidade de perda de inserção ($P < 0,05$), com exceção de sangramento gengival marginal e cálculo. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na prevalência da contagem 10^6 células/ml e na contagem total das bactérias avaliadas entre os grupos. Na análise dos sujeitos que tiveram apenas as maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$), tanto na análise bruta quanto na ajustada houve uma prevalência significativamente maior de indivíduos no grupo exposto ao crack.

Conclusão: O perfil microbiológico de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* não diferiu entre expostos e não expostos ao crack.

Relevância Clínica

Razões científicas do estudo: Escassez de estudos que avaliem o perfil microbiológico em indivíduos usuários de crack, apenas um estudo fez essa análise.

Principais achados: Apesar dos expostos ao crack apresentarem maior severidade de perda de inserção, não foram encontradas diferenças nas contagens microbiológicas entre os grupos, exceto na análise dos sujeitos com maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$), uma prevalência significativamente maior de indivíduos no grupo exposto ao crack foi encontrada.

Implicações práticas: A forma como a droga modifica a doença periodontal nos usuários, pode não estar relacionada ao perfil microbiológico, mas sim a outras alterações locais e sistêmicas.

Introdução

O aumento no consumo de crack vem chamando a atenção, devido ao seu consequente impacto físico e emocional dos usuários bem como, pelas repercussões políticas, sanitárias e sociais (Kaushik et al. 2011). Há poucos estudos disponíveis investigando o impacto do consumo de crack nas condições bucais (Woyceichoski et al. 2008).

A plausibilidade biológica para a associação entre crack e periodontite está nas características locais, como calor gerado, vasoconstrição, trauma mecânico quando o produto é friccionado na gengiva, diminuição do fluxo salivar (Mitchell-Lewis et al. 1994; Mateos-Moreno et al. 2013) e os efeitos deletérios na resposta imunológica de seus usuários (Shen et al. 1994; Parry et al. 1996; Baldwin et al. 1997; Pellegrino & Bayer 1998; Cabral 2006; Kaushik et al. 2011). Ainda, uma diminuição da auto-estima, um descuido com a higiene e, por consequência, uma higiene bucal precária, além da pouca procura ao atendimento odontológico e do baixo nível socioeconômico dos usuários podem também explicar a associação (Scheutz 1984; Friedlander & Mills 1985; Parry et al. 1996)

Alguns microrganismos como *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) (Genco et al. 1996), *Prevotella intermédia* (*Pi*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), (Albandar et al. 1997; Socransky et al. 1998; Takeuchi et al. 2003) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) (Zambon 1985; Slots & Ting 1999; Cortelli et al. 2005) estão frequentemente associados à progressão das doenças periodontais. Comparações entre microbiota supra e subgengival de sujeitos saudáveis e com periodontite demonstraram contagens mais elevadas de periodontopatógenos nos sujeitos com doença periodontal (Nonnenmacher et al. 2004; Ximenez-Fyvie et al. 2000a). Sabe-se que infecções têm sido reconhecidas como uma das complicações mais graves de abuso de drogas (Scheidegger & Zimmerli 1989). Fatores relacionados ao uso, tais como, o uso de seringas não esterilizadas, aparatos como latas de alumínio, cachimbos, tubos contaminados e drogas adulteradas, poderiam aumentar a exposição a patógenos microbianos (Gordon & Lowy 2005). Há apenas 1 estudo que comparou a detecção de *P.gingivalis*, *P.intermédia*, *Micromonas micros* (*M.micros*), *Eikenella corrodens* (*E.corrodens*), *F.nucleatum*, *Tannerella forsythia* (*T.forsythia*), *Campylobacter rectus* (*C.rectus*), *Capnocytophaga spp* e *Eubacterium spp*. em usuários comparados a não usuários de drogas ilícitas, não encontrando

diferenças microbiológicas, apesar dos usuários apresentarem significativamente piores condições periodontais. Entretanto, a técnica utilizada para detecção não foi relatada (Mateos-Moreno et al. 2013).

Considerando a escassez de evidências que tenham avaliado a contagem de periodontopatógenos no biofilme de usuários de crack, buscou-se testar a hipótese conceitual de que usuários de crack apresentariam maior prevalência de contagens de periodontopatógenos, comparados a não usuários.

Materiais e métodos

Participantes e delineamento do estudo

Um estudo transversal, com amostra de conveniência, foi realizado na cidade de Santa Maria, RS, com indivíduos expostos e não expostos ao crack. Os dados foram coletados de agosto de 2012 a dezembro de 2013. Existem apenas duas instituições públicas para tratamento com internação de dependentes químicos, as quais todos os indivíduos, no período desse estudo, foram incluídos. O comitê de ética em pesquisa do Centro Universitário Franciscano aprovou o protocolo do estudo (CAAE: 02451812.6.0000.5306) e todos os participantes após informações, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Crítérios de elegibilidade

Indivíduos usuários de crack foram selecionados de duas instituições para tratamento de dependência química. Os mesmos deveriam ser usuários da droga por pelo menos 1 ano e não poderiam apresentar comprometimento cognitivo (Klein et al. 1985). Três tentativas foram feitas para examiná-los. Para cada sujeito exposto, um indivíduo controle foi selecionado, nunca usuário de droga ilícita (autorelato), pareados para sexo, idade (com variação de três anos para mais ou para menos) e fumo (fumante ou nunca fumante), de escolas públicas e de sujeitos triados (Examinados previamente ao atendimento odontológico) no curso de Odontologia do Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS. Indivíduos que apresentassem doenças sistêmicas, como, Diabetes mellitus, HIV/AIDS, neoplasias

e doenças auto-imunes, assim como, portadores de aparelho e contenção ortodônticos, que faziam uso de medicamentos associados ao aumento de volume gengival e mulheres grávidas foram excluídos do estudo.

Tamanho da amostra

O estudo foi planejado para coleta de dados clínicos e microbiológicos. Para o estudo clínico o tamanho da amostra foi estimado a partir de uma prevalência de periodontite nos não expostos de 41.2% e nos expostos de 67.6% (RP=2.98) (Susin et al. 2011), o que indicou a necessidade de 212 participantes (106 em cada grupo). Para análise microbiológica, o cálculo amostral foi baseado em uma prevalência de *A.actinomycescomitans* nos não expostos de 77% e nos expostos de 95% (RP=5.7) (Nonnenmacher et al. 2005), considerando ainda uma proporção não expostos:expostos de 1:1, poder de 80%, nível de significância de 5% e teste de hipótese bicaudal, seriam necessários 136 indivíduos, sendo 68 não expostos e 68 controles. Considerando a análise multivariada, recusas e possíveis perdas das amostras, a amostra foi aumentada em 20%, resultando em um total de 82 não expostos e 82 expostos (Total de 164 indivíduos). Este tamanho amostral foi compatível para captar diferenças entre nunca fumantes e fumantes, baseado no odds ratio de 13,07 de *A.actinomycescomitans* nos expostos (Guglielmelli et al., 2014). Considerando ainda uma proporção não expostos:expostos de 1:1, poder de 80%, nível de significância de 5% e teste de hipótese bicaudal seriam necessários 52 indivíduos, sendo 26 não expostos e 26 controles. Adicionando-se 20% para eventuais perdas, o valor total requerido foi de 128 crianças.). A amostra para os dados microbiológicos foi preenchida por saturação até completar o N total necessário.

Coleta de dados

Dados demográficos, socioeconômicos e odontológicos foram coletados em uma entrevista estruturada. O uso de substâncias psicoativas foi avaliado com um questionário fechado testado e adaptado para população brasileira (Smart et al.

1980) em local isolado. As entrevistas foram realizadas por dois indivíduos devidamente treinados (FBL e ARS). O questionário foi reaplicado no intervalo de 4 meses para 10% da amostra, e a confiabilidade teste-reteste foi analisada pelo Kappa (K variou de 0,81 a 1,0). Os exames clínicos foram realizados por uma única examinadora (R.P.A.) calibrada em cadeira comum, sala com luz natural e artificial associada a um foco de luz branca artificial portátil acoplada na cabeça e isolamento relativo (OMS, 1997). Todos os dentes erupcionados, foram avaliados usando uma sonda periodontal manual tipo Willians (Neumar®, São Paulo, SP, Brasil) exceto terceiros molares, em seis sítios por dente, para os parâmetros profundidade de sondagem (PS), Nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS). O Índice de placa visível (IPV), sangramento gengival marginal (ISG) (Ainamo & Bay 1975) e cálculo dentário (presença /ausência) foram determinados em quatro sítios por dente. Tanto usuários quanto controles foram examinados da mesma forma. A calibragem da examinadora demonstrou uma correlação intraclasse foi de 0,96 e 0,94 para PS e NIC, respectivamente, no início do estudo e de 0,93 e 0,91, após 07 meses do início do estudo.

Coleta microbiológica

Após o exame clínico, foram realizadas coletas de biofilme de quatro sítios de dentes não adjacentes com maiores valores de PS. Cada dente foi isolado com roletes de algodão, sendo realizada a remoção do biofilme supragengival com gaze estéril. Um cone de papel estéril nº 30 (Tanari®, Curitiba, PR, Brasil), foi inserido na porção mais apical da bolsa e mantido na posição por 20 segundos. Após, foram imediatamente transferidos e acondicionados em um mesmo microtubo (Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), agrupadas, formando um pool. Foram armazenados em um isopor contendo gelo, e levados a um refrigerador a -20°C até o seu processamento. O tempo de transporte da coleta até o armazenamento em ambiente refrigerado, durou em média de 40 a 60 minutos.

Processamento das amostras

O DNA foi extraído através do Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), conforme o protocolo descrito pelo fabricante. Todas as amostras

foram analisadas quanto a quantidade e a pureza do DNA por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000 Thermo Scientific, USA). As amostras adequadas apresentaram leitura das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm com uma concentração inicial entre 0,5 – 0,6µg/µL de cada DNA das amostras.

Foi utilizada PCR convencional para padronizar as reações de PCR, onde foi verificada a capacidade de amplificação dos primers e gradientes de temperatura. As temperaturas de anelamento selecionadas foram 55,4°C, 55°C, 58°C e 58°C para *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*, *P.intermédia* e *F.nucleatum* (*Pg* ATCC-33277, *Aa* ATCC 33384, *Pi* ATCC 25611, *Fn* ATCC 49256) respectivamente. Os primers utilizados no estudo foram sintetizados pela empresa IDT[®] (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA). Os DNAs extraídos foram amplificados e marcados com Syber Green Mix/ROX (Ludwig biotecnologia, Porto Alegre, Brasil) (Maeda et al. 2003). As reações de qPCR foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Image Quant 100 – GE Healthcare[®], Piscataway, New Jersey, USA). Todas as reações foram realizadas em volume total de 20µL contendo 10µL Sybr Green mix/ROX (Ludwig biotecnologia, Porto Alegre, Brasil) e 0,83 µl de cada par de oligonucleotídeo IDT[®] (Integrated DNA technologies, Iowa, USA). Devido a diferença na quantidade de pureza e DNA das amostras, o volume foi ajustado com H₂O estéril livre de DNase e RNase. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA molde. A termociclagem utilizada foi de 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55,4°C (*Pg*), 55°C (*Aa*), 58°C (*Fn* e *Pi*) por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação de qPCR, foi realizada uma curva de dissociação (curva de melting) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação. Todas as reações foram realizadas em tubos MicroAmp[®] Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL, 125 strips (Applied Biosystems[®], Concord, Ontario, Canada). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One™ (Applied Biosystems[®], Concord, Ontario, Canada). Para realização da curva padrão primeiramente foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi verificada a leitura óptica em

espectrofotômetro (NanoDropTM 1000 Thermo Scientific, USA) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm. Assim, foi obtida uma concentração inicial entre 0,5 - 0,6 µg/µL de cada DNA bacteriano e em seguida, realizada 6 diluições seriadas, onde já se conhecia a concentração de DNA. Após a otimização foram selecionadas apenas 4 diluições para confecção da curva padrão, com DNA extraído da cultura da bactéria pura. A curva padrão (a qual possui concentração conhecida) foi utilizada para converter os score de Ct (Cycle Treshold) obtidos com as amostras em números exatos de concentração de DNA (Morillo et al. 2004).

Análise dos dados

Dois desfechos microbiológicos foram considerados para a análise dos dados: A prevalência de sujeitos com contagem $\geq 10^6$ para cada bactéria (Masunaga et al. 2010) e a contagem total de cada bactéria. As variáveis independentes foram categorizadas em: gênero (feminino / masculino); idade em anos (mediana dos controles: < 24 / ≥ 24); raça auto referida (brancos/não brancos), escolaridade em anos completos de estudo (≤ 8 / > 8 anos – ensino primário no Brasil); renda familiar em salários mínimos Brasileiro (SMB) (1SMB=750,00 reais, equivalente a aproximadamente US\$ 300 durante o período do estudo) (mediana dos controles $\leq 1,4$ / $> 1,4$ SMB); fumo de cigarro (não fumante: ≤ 1 maço na vida / fumante atual: > 1 maço na vida), fumo de crack (nunca usuários / usuários por no mínimo 1 ano), os escores para crack foram uso frequente (1 – 19 vezes por mês), uso pesado (≥ 20 vezes por mês) (Smart et al. 1980). Periodontite foi definida por perda de inserção ≥ 4 mm e profundidade de sondagem ≥ 4 mm afetando sítios interproximais não adjacentes de dois ou mais dentes (van der Velden 2005; Savage et al. 2009)

A normalidade de distribuição das variáveis foi testada (teste Shapiro-wilk). As características da amostra e variáveis associadas aos dados microbiológicos foram comparadas pelos testes Wilcoxon e McNemar com nível de significância de 5%. Modelos de regressão de Poisson com variância robusta foram rodados para avaliar co-variáveis associadas aos desfechos microbiológicos. Três análises foram realizadas, uma entre a exposição ao crack e prevalência de sujeitos com a contagem microbiológica $\geq 10^6$ para cada bactéria (razão de prevalência), outra entre

a exposição ao crack e a contagem total de cada microrganismos (razão de média) e outra entre a exposição ao crack e prevalência dos sujeitos que tiveram apenas as maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$). A modelagem foi realizada eliminando sequencialmente as variáveis com maior valor de P até permanecerem para a análise ajustada apenas as com $P < 0,20$. Apenas as variáveis com $P < 0,05$ ficaram retidas no modelo final ajustado. Ainda, as variáveis periodontite e profundidade de sondagem nos sítios de coleta ($PS \leq / > 4$ mm) foram mantidas no modelo final independentemente do valor de P. Os dados foram analisados com o software PASW, versão 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, PASW, Chicago, III).

Resultados

Um total de 155 indivíduos, 74 expostos e 81 controles foram incluídos. Na análise total, foram coletados desfechos periodontais de 212 indivíduos. A taxa de resposta foi de 85% (212/248) e a perda de amostras microbiológicas foi de 8,6% (164/155). As razões para a não participação estão apresentadas no fluxograma do estudo (Figura 1). A tabela 1 demonstra que a amostra foi composta predominantemente por homens, fumantes e brancos. A idade dos sujeitos variou entre 13 e 46 anos, sendo semelhante entre os grupos (mediana (P25-P75): expostos: 25,0 (18 – 33) anos; não expostos: 25,6 (18 – 31) anos.

A tabela 2 demonstra que aproximadamente 60% dos sujeitos expostos consumiram a droga durante os trinta dias antes da internação. O método de consumo da droga de todos foi fumado e 47,6% estavam internados a menos de 21 dias. A maioria dos usuários apresentava um consumo pesado de crack, assim como, haviam utilizado anterior ou concomitantemente ao crack, cocaína (94,6%), maconha (82,4%) e solvente (41,9%).

A tabela 3 demonstrou uma prevalência de periodontite de 27,2% e 62,2% para controles e usuários, respectivamente. Sujeitos expostos apresentaram maiores percentuais de IPV, SS e sítios com PS e NIC de 4-6 e >6 mm ($P < 0,05$). Sítios de coleta microbiológica dos expostos ao crack foram significativamente mais profundos (PS) quando comparados a não usuários ($P < 0,05$).

A tabela 4 apresenta razão de prevalência de contagem microbiológica $\geq 10^6$ células/ml de acordo com a exposição ao crack, onde as análises bruta e ajustada não demonstraram associação significativa entre a exposição ao crack e contagens $\geq 10^6$. A razão de média da contagem total de cada espécie bacteriana de acordo com a exposição ao crack, onde sujeitos expostos demonstraram médias de contagem bacteriana de *Pi* e *Fn* foi 4,3 e 4,6 vezes maior que indivíduos não usuários, respectivamente. Entretanto, após ajuste para periodontite e PS dos sítios coletados em modelo multivariado, a medida de efeito perdeu a associação ($P > 0,05$).

Quando analisados os sujeitos que tiveram apenas as maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$), a tabela 5 demonstrou que tanto na análise bruta quanto na ajustada houve uma prevalência significativamente maior de indivíduos no grupo exposto ao crack. Nesses indivíduos, 77% eram fumantes pesados de crack, 56% estiveram em atendimento odontológica a menos de 12 meses antes de internarem na instituição, e 95,4% eram poliusuários de drogas.

Discussão

Considerando as características clínicas, não foram encontradas diferenças significativas no sangramento gengival marginal e cálculo supragengival. Entretanto, sujeitos expostos ao crack apresentaram maior prevalência e severidade de periodontite que não usuários. Contudo, o perfil microbiológico de contagens de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermédia* e *F.nucleatum* não diferiu entre expostos e não expostos ao crack na análise $\geq 10^6$ células/ml e na contagem total. Quando analisados apenas sujeitos com maiores contagens bacterianas ($\geq 75\%$), indivíduos expostos ao crack apresentaram maior prevalência dessas bactérias. De uma forma geral a nossa hipótese conceitual foi rejeitada.

Evidências transversais têm demonstrado proporções mais elevadas de *P.gingivalis*, *T.forsythia*, espécies de *Prevotella* (Ximenez-Fyvie et al. 2000b), *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Treponema* e *T.denticola* no biofilme subgengival de sujeitos com periodontite (Ximenez-Fyvie et al. 2000a). Também, sujeitos com periodontite apresentam contagens mais elevadas de periodontopatógenos no

biofilme subgengival (Nonnenmacher et al. 2004; Ximenez-Fyvie et al. 2000a). Ainda, têm-se observado que a contagem bacteriana subgengival tem relação com o microambiente local, onde sítios com maiores profundidades de sondagem apresentam proporções mais elevadas de microrganismos do complexo vermelho e laranja (Nonnenmacher et al. 2005; Ximenez-Fyvie et al. 2000b). Na avaliação da contagem total bacteriana para *P.intermédia* e *F.nucleatum*, após a inclusão das variáveis clínicas no modelo multivariado, a medida de efeito perdeu a associação, o que sugere que a profundidade de sondagem dos sítios de coleta e a periodontite são variáveis confundidoras da associação entre o uso do crack e contagem total para essas duas bactérias (Jimenez & Dietrich 2012). Entretanto, para aproximadamente um terço dos pacientes, os quais apresentaram as maiores contagens bacterianas (\geq percentil 75% da contagem total de cada bactéria), foram encontradas maiores prevalências de sujeitos no grupo exposto ao crack, mesmo após ajuste para as variáveis confundidoras.

Algumas hipóteses podem explicar porquê alguns usuários tem mais periodontite apesar da ausência de diferenças microbiológicas entre os grupos. Uma delas é a de que os usuários de crack apresentem maior prevalência e gravidade de periodontite pelos efeitos sistêmicos da droga e não por fatores microbiológicos pelo fato da amostragem ter sido pareada para sexo, idade e fumo (Molendijk et al. 1996; Kapila & Kashani 1997; Mateos-Moreno et al. 2013). Sabe-se que a doença periodontal é multifatorial e sua progressão pode ser modificada por diferentes fatores e indicadores de risco (Michalowicz et al. 1991; Barr et al. 1992; Wolff et al. 1994; Genco et al. 1999; Salvi et al. 2008; Al Habashneh et al. 2010; Teeuw et al. 2010). O crack e a cocaína estão associados com alterações do sistema imune (Clark et al. 2013; Pellegrino & Bayer 1998; Stefanidou et al. 2011), tais como, aumento de interleucina-8, quimiotaxia de PMNs (Baldwin et al. 1997) e na atividade da MMP-9 após 1-3 horas de exposição a cocaína (Brown et al. 2008). Outras evidências relataram que a cocaína alterou o equilíbrio homeostático das citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 (Shen et al. 1994; Pellegrino & Bayer 1998; Cabral 2006). O crack parece desencadear uma atividade fagocítica ainda menor quando comparado à cocaína (Pellegrino & Bayer 1998; Cabral 2006), o que sugere que seus efeitos deletérios sistêmicos sejam ainda mais fortes. Ainda, algumas repercussões locais causadas pelo crack podem explicar o maior risco de progressão de doença periodontal tais como a necrose tecidual, calor gerado

durante o consumo da droga e a vasoconstrição (Woyceichoski et al. 2008; Kaushik et al. 2011). O somatório dessas alterações interferem e modificam a capacidade de resposta frente ao biofilme subgengival, podendo modificar a progressão da doença periodontal (Kinane et al. 2011; Cekici et al. 2014).

Nossos dados corroboram parcialmente com os de Mateos-Moreno et al. (2013) que também não encontraram diferenças microbiológicas entre poliusuários de drogas comparados a não usuários, apesar dos expostos a droga apresentarem piores condições periodontais. Porém, nesse estudo não foi esclarecida a metodologia de detecção microbiológica e as principais drogas utilizadas por esses usuários foram à cocaína e a heroína, não havendo informações sobre o uso do crack. Nosso estudo demonstrou que em uma parcela dos usuários de crack, as contagens microbianas foram superiores ou igual a 75% da contagem total, sendo que esses indivíduos apresentaram um consumo 77,1% pesado de crack, 56,0% tiveram atendimento odontológico nos últimos 12 meses antes da internação, e 95,4% era poliusuário de drogas. Assim, o efeito do crack na microbiota bucal é um assunto novo e nosso estudo acrescenta nova informação na literatura.

Atualmente, o qPCR é considerado superior para detecção e quantificação de espécies pela alta sensibilidade e especificidade (Lau et al. 2004; Nonnenmacher et al. 2005), simplicidade e rapidez (Atieh 2008). Assim, uma hipótese para a não detecção de diferenças microbiológicas se deva a alta sensibilidade da técnica de qPCR (Lau et al. 2004), a qual detectou sensivelmente a contagem bacteriana em ambos os grupos. Foi utilizada análise de regressão de Poisson com variância robusta para estimar as razões de médias e razões de prevalências, as quais são mais fáceis de serem interpretadas que a Odds Ratio e, em situações com prevalências maiores que 50%, a odds ratio pode superestimar as razões de prevalência (Barros & Hirakata 2003). Portanto, o uso do qPCR, a escolha das bactérias e a forma de analisar os dados reforça nossos achados.

Nossos dados mostraram maiores percentuais de placa nos usuários, porém sem diferenças no percentual de gengivite e cálculo supragengival, demonstrando que ambos os grupos apresentavam hábitos de higiene bucal semelhantes. Há de se considerar que indivíduos que aceitaram a internação e o tratamento da dependência passam por um momento de aceitação e de maior atenção com sua saúde, incluindo a saúde bucal. Além disso, devido a uma exigência das instituições de tratamento, mais da metade dos expostos ao crack receberam atendimento

odontológico em menos de 1 ano da data da avaliação. Gomes et al. (2008) demonstrou que apenas o controle do biofilme supragengival pelo binômio paciente-profissional pode diminuir a carga microbiana subgengival, independentemente da profundidade de sondagem e do status de fumo (GOMES et al. 2008). Assim, essas explicações podem ajudar a explicar o porquê não foram detectadas diferenças microbiológicas entre os sujeitos expostos e não expostos ao crack. Há também que se considerar o grande percentual de fumantes de tabaco tanto nos expostos quanto nos controles (86,5% e 80,2%, respectivamente), o que contribui para aumento de periodontopatógenos em ambos os grupos. Guglielmetti et al. (2014), utilizando qPCR, encontraram quantidades significativamente aumentadas de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* e *T.forsythia* em fumantes com periodontite crônica do que em nunca fumantes.

Algumas limitações também são encontradas no nosso estudo. A exposição de pelo menos um ano de fumo de crack foi escolhida pois seria menos provável que uma recente exposição pudesse modificar clínica e microbiologicamente a doença periodontal dos expostos. Entretanto, pode ter ocorrido um viés de informação por uma possível subestimação de informações referentes ao uso de drogas ilícitas em ambos os grupos (Abdalla et al. 2014). A amostra ter sido de conveniência, que pode não representar a população, considerando que os centros de referências podem concentrar indivíduos com maior exposição de potenciais confundidores como diferenças de severidade de doença periodontal entre os grupos. Entretanto, as exposições potencialmente confundidoras foram controladas pelo pareamento e pela análise multivariada. Também, observações transversais de usuários de drogas ilícitas são insuficientes para a compreensão do efeito do uso crônico de diferentes drogas nas condições periodontais clínicas e microbiológicas dos usuários. Ainda, evidências demonstram que dificilmente um dependente de drogas ilícitas utilizou somente um tipo de droga no decorrer de sua dependência (Oliveira and Nappo, 2008). Nossos dados corroboram essa tendência pela alta frequência de exposição prévia à cocaína e maconha e percentuais mais baixos de outras drogas. O uso de outras drogas pode ter efeito sinérgico na deterioração periodontal e confundir as estimativas de associação entre crack e desfechos microbiológicos. Porém, o poliuso de drogas ilícitas não foi considerado na análise multivariada devido à dificuldade de se estimar a dose de exposição a cada droga.

Nossos resultados são direcionados para indivíduos usuários de crack, em tratamento para a dependência e que apresentem características sociodemográficas e comportamentais semelhantes aos indivíduos da amostra, composta predominantemente por fumantes de tabaco, homens, brancos, de baixa escolaridade e renda.

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas nas comparações microbiológicas para *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia* e *F.nucleatum*, os expostos ao crack apresentaram maior severidade de perda de inserção, sugerindo a necessidade de estratégias mais amplas para promoção de saúde bucal para estes indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, R.R. et al., (2014). Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian national alcohol and drugs survey (BNADS). *Addict Behav*, **39**, 297–301.
- Ainamo, J. & Bay, I., (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*, **25**, 229–235.
- Albandar, J.M., Brown, L.J. & Loe, H., (1997). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **68**, 973–981.
- Atieh, M.A., (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol*, **79**, 1620–1629.
- Baldwin, G.C. et al., (1997). Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. A potential etiology for pulmonary injury. *Chest*, **111**, 698–705.
- Barr, C., Lopez, M.R. & Rua-Dobles, A., (1992). Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Clin Periodontol*, **19**, 794–801.
- Barros, A.J.D. & Hirakata, V.N., (2003). Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC medical research methodology*, **3**, 1-21.
- Brown, T.E. et al., (2008). Increase in matrix metalloproteinase-9 levels in the rat medial prefrontal cortex after cocaine reinstatement of conditioned place preference. *Synapse*, **62**, 886–889.
- Cabral, G.A., (2006). Drugs of abuse, immune modulation, and AIDS. *J Neuroimmune Pharmacol*, **1**, 280–295.
- Cekici, A. et al., (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, **64**, 57–80.
- Clark, K.H., Wiley, C.A. & Bradberry, C.W., (2013). Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox Res*, **23**, 174–188.
- Cortelli, J.R. et al., (2005). Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **32**, 860–866.
- Friedlander, A.H. & Mills, M.J., (1985). The dental management of the drug-dependent patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **60**, 489–492.

Genco, R. et al., (1996). Consensus Report Periodontal Diseases : Pathogenesis and. *Ann Periodontol*, **1**, 926–32.

Genco, R.J. et al., (1999). Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*, **70**, 711–723.

Gomes, S.C. et al., (2008). The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*, **79**, 2297–2304.

Gordon, R.J. & Lowy, F.D., (2005). Bacterial infections in drug users. *N Engl J Med*, **353**, 1945–1954.

Guglielmetti, M.R. et al., (2014). Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*, **85**, 1450–1457.

Al Habashneh, R. et al., (2010). Association between periodontal disease and osteoporosis in postmenopausal women in Jordan. *The Journal of periodontology*, **81**, 1613–1621.

Haffajee, A.D. & Socransky, S.S., (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, **5**, 78–111.

Jimenez, M. & Dietrich, T., (2012). Regression models in periodontal epidemiology: Purpose, approach and interpretation. *Periodontology 2000*, **58**, 121–133.

Kapila, Y.L. & Kashani, H., (1997). Cocaine-associated rapid gingival recession and dental erosion. A case report. *J Periodontol*, **68**, 485–488.

Kaushik, K.S., Kapila, K. & Praharaj, A.K., (2011). Shooting up: the interface of microbial infections and drug abuse. *J Med Microbiol*, **60**, 408–422.

Kinane, D.F., Preshaw, P.M. & Loos, B.G., (2011). Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, **38**, 44–48.

Lau, L. et al., (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samp. *J Clin Periodontol*, **31**, 1061–1069.

Maeda, H. et al., (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **39**, 81–86.

Masunaga, H. et al., (2010). Use of quantitative PCR to evaluate methods of bacteria sampling in periodontal patients. *J Oral Sci*, **52**, 615–621.

- Mateos-Moreno, M. V et al., (2013). Dental profile of a community of recovering drug addicts: Biomedical aspects. Retrospective cohort study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **18**, 671–9.
- Michalowicz, B.S. et al., (1991). Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol*, **62**, 293–299.
- Mitchell-Lewis, D.A. et al., (1994). Identifying oral lesions associated with crack cocaine use. *J Am Dent Assoc*, **125**, 1104–1110.
- Molendijk, B. et al., (1996). Dental health in Dutch drug addicts. *Community Dent Oral Epidemiol*, **24**, 117–119.
- Morillo, J.M. et al., (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*, **31**, 1054–1060.
- Nonnenmacher, C. et al., (2004). Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*, **59**, 117–125.
- Nonnenmacher, C. et al., (2005). Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*, **76**, 1542–1549.
- Parry, J. et al., (1996). Mucosal lesions due to oral cocaine use. *Br Dent J*, **180**, 462–464.
- Pellegrino, T. & Bayer, B.M., (1998). In vivo effects of cocaine on immune cell function. *J Neuroimmunol*, **83**, 139–147.
- Salvi, G.E., Carollo-Bittel, B. & Lang, N.P., (2008). Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*, **35**, 398–409.
- Savage, A. et al., (2009). A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol*, **36**, 458–467.
- Scheidegger, C. & Zimmerli, W., (1989). Infectious complications in drug addicts: seven-year review of 269 hospitalized narcotics abusers in Switzerland. *Rev Infect Dis*, **11**, 486–493.
- Scheutz, F., (1984). Dental health in a group of drug addicts attending an addiction-clinic. *Community Dent Oral Epidemiol*, **12**, 23–28.
- Shekarchizadeh, H. et al., (2013). Oral health behavior of drug addicts in withdrawal treatment. *BMC Oral Health*, **13**, 1-11.
- Shen, H.M., Kennedy, J.L. & Ou, D.W., (1994). Inhibition of cytokine release by cocaine. *Int J Immunopharmacol*, **16**, 295–300.

- Slots, J. & Ting, M., (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, **20**, 82–121.
- Smart, R. et al., (1980). A Methodology for Student Drug-use Surveys. *World Health Organization*, **1**, 1-55.
- Socransky, S.S. et al., (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, **25**, 134–144.
- Stefanidou, M. et al., (2011). Immunotoxicity of cocaine and crack. *Curr Drug Abuse Rev*, **4**, 95–97.
- Susin, C. et al., (2011). Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *J Clin Periodontol*, **38**, 326–333.
- Takeuchi, Y. et al., (2003). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol*, **74**, 1460–1469.
- Teeuw, W.J., Gerdes, V.E. & Loos, B.G., (2010). Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, **33**, 421–427.
- Van der Velden, U., (2005). Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol 2000*, **39**, 13–21.
- Wolff, L., Dahlen, G. & Aepli, D., (1994). Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*, **65**, 498–510.
- Woyceichoski, I.E. et al., (2008). Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **105**, 745–749.
- Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D. & Socransky, S.S., (2000)a. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, **27**, 648–657.
- Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D. & Socransky, S.S., (2000)b. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, **27**, 722–732.
- Zambon, J.J., (1985). Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **12**, 1–20.

Tabela 1 - Características da amostra de acordo com a exposição ao crack em indivíduos usuários e controles.

	Usuários de Crack (n=74)	Controles (n=81)	P
Características pareadas	n (%)		
Idade (Anos) ^a	25,0(18,0-33,0)	25,6(18,0-31,0)	
≤ 24	34 (49,5)	39 (48,1)	1,000
> 24	40 (54,1)	42 (51,9)	
Gênero			
Mulheres	16 (21,6)	19 (23,5)	1,000
Homens	58 (78,4)	61 (76,5)	
Fumo (Anos) ^a	10,6 (3,0-16,2)	7,2 (1,5-10,5)	
Não fumante	10 (13,5)	16 (19,8)	0,405
Fumante	64 (86,5)	65 (80,2)	
Características não pareadas			
Raça			
Branco	48 (64,9)	59 (72,8)	0,307
Não Branco	26 (35,1)	22 (27,2)	
Escolaridade (Anos)^c			
> 8	25 (33,8)	46 (56,8)	0,010
≤ 8	49 (66,2)	35 (43,2)	
Renda familiar mensal (SMB)^a			
≤ 1,4	47 (63,5)	44 (54,3)	0,243
> 1,4	27 (36,5)	37 (45,7)	

^aMediana (P25-P75). ^bSMB:Salário Mínimo Brasileiro ≈ US\$300 durante o estudo.
 Teste McNemar, nível de significância 5%;

Tabela 2 – Distribuição do uso de crack de acordo com variáveis de interesse.

Variável	Usuário de Crack (n=74) (Média ± dp)
Tempo de uso do <i>crack</i> (anos)	4,66 ± 3,94
Número de pedras consumidas/dia	26,40 ± 30,96
Tempo de internação (meses)	2,50 ± 2,78
Consumo do crack n (%)	
Frequente	17 (12,2)
Pesado	57 (77,0)
Poliuso de drogas ilícitas n (%)	
Cocaína	70 (94,6)
Maconha	61 (82,4)
Solvente	31 (41,9)
Doenças sistêmicas n (%)	
Hepatite	9(12,2)

Tabela 3 - Comparações das variáveis clínicas e microbiológicas, entre indivíduos expostos e não expostos ao crack.

	Usuários de Crack (Média±dp) (n=74)	Controles (Média±dp) (n=81)	P
IPV (%) ^a	53,01±22,65 ^a	44,91±17,73 ^b	0,045
ISG (%) ^a	39,28±17,30 ^a	36,56±15,41 ^a	0,489
Cálculo supra ^a	25,19±24,27 ^a	21,41±17,88 ^a	0,504
SS (%) ^a	52,63±20,15 ^a	44,96±18,34 ^b	0,041
PS (mm) ^a	2,71±0,58 ^a	2,50±0,37 ^b	0,080
NIC (mm) ^a	2,84±1,14 ^a	2,53±0,40 ^b	0,078
PS 1-3mm (%) ^a	87,53±15,51 ^a	94,26±10,72 ^b	0,001
PS 4-6mm (%) ^a	11,32±12,83 ^a	5,68±10,50 ^b	0,001
PS > 6mm (%) ^a	1,23±4,95 ^a	0,05±0,44 ^b	0,001
NIC 1-3mm (%) ^a	85,70±18,77 ^a	92,43±15,25 ^b	0,001
NIC 4-6mm (%) ^a	11,82±13,45 ^a	5,99±10,16 ^b	0,002
NIC > 6mm (%) ^a	2,50±11,65 ^a	0,32±1,26 ^b	0,044
Periodontite ^b	62,20 (48,82) ^a	27,20 (44,75) ^b	0,000
PS PCR1 ^a	4,52 (1,70) ^a	3,58 (0,82) ^b	0,000
PS PCR 2 ^a	4,64 (1,50) ^a	3,70 (0,93) ^b	0,000
PS PCR 3 ^a	4,74 (1,77) ^a	3,66 (0,93) ^b	0,000
PS PCR 4 ^a	4,57 (1,14) ^a	3,76 (0,91) ^b	0,000
PS PCR total ^a	4,65 (1,33) ^a	3,68 (0,76) ^b	0,000

IPV (índice de placa visível), ISG (índice de sangramento gengival), SS (sangramento gengival), PS (profundidade de sondagem), NIC (nível de inserção clínica), PS PCR 1 (profundidade de sondagem do 1º sítio de coleta para PCR), PS PCR 2 (profundidade de sondagem do 2º sítio de coleta para PCR), PS PCR 3 (profundidade de sondagem do 3º sítio de coleta para PCR), PS PCR 4 (profundidade de sondagem do 4º sítio de coleta para PCR), PS PCR TOTAL (média de profundidade de sondagem dos 4 sítios coletados para PCR); P comparação entre usuários de crack e controle, nível de significância 5%;

^a Teste Wilcoxon;

^b Teste McNemar;

Tabela 3 - Razão de prevalência (RP) de contagens microbiológicas ($\geq 10^6$) e razão de média (RM) da contagem total de cada espécie bacteriana de acordo com a exposição ao Crack (n=155).

Espécie Bacteriana	Usuários de Crack n (%) n 74	Controles n (%) n 81	RP [†] /RM ^{&} (IC 95%) Bruta	P*	RP [†] /RM ^{&} (IC 95%) Ajustada	P [#]
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	33(44,6%) -	31(38,3%) -	1,16(0,80-1,69) [†] 5,82(0,74-45,78) ^{&}	0,425 0,094	1,12(0,74-1,70) [†] 7,38(0,99-54,94) ^{&}	0,566 0,051
<i>P. gingivalis</i>	31(41,9%) -	26(32,1%) -	0,85(0,67-1,09) [†] 5,63(0,65-48,17) ^{&}	0,212 0,115	0,91(0,70-1,18) [†] 10,76(0,90-128,38) ^{&}	0,502 0,060
<i>P. intermedia</i>	59(79,7%) -	61(75,3%) -	1,05(0,89-1,25) [†] 4,37(1,05-18,24) ^{&}	0,510 0,004	1,01(0,84-1,21) [†] 1,54(0,42-5,53) ^{&}	0,881 0,509
<i>F. nucleatum</i>	62(16,2%) -	65(19,7%) -	1,04(0,90-1,21) [†] 4,60(1,10-19,26) ^{&}	0,566 0,036	1,03(0,89-1,20) [†] 1,78(0,50-6,39) ^{&}	0,672 0,370

* Regressão de Poisson com variância robusta tendo como referência os sujeitos controles não expostos ao crack;

Regressão de Poisson ajustada para periodontite e PS do sítio coletado, tendo como referência os sujeitos controles não expostos ao crack;

† Razão de prevalência;

& Razão de média;

Tabela 4 - Razão de prevalência (RP) da contagem total de cada espécie bacteriana no quartil 75% de acordo com a exposição ao Crack (n=155).

Espécie Bacteriana	n (%)^φ	RQ (IC 95%) Bruta	P*	RQ (IC 95%) Ajustada	P[#]
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	25 (33,8)	1,95 (1,10 – 3,47)	0,022	2,08 (1,14 – 3,79)	0,017
<i>P. gingivalis</i>	26 (35,1)	2,03 (1,15 – 3,58)	0,014	2,12 (1,14 – 3,95)	0,018
<i>P. intermedia</i>	29 (39,2)	3,17 (1,66 – 6,05)	0,000	2,24 (1,15 – 4,33)	0,017
<i>F. nucleatum</i>	29 (39,2)	3,17 (1,66 – 6,05)	0,000	2,23 (1,15 – 4,33)	0,017

φ Grupo de expostos ao Crack;

* Regressão de Poisson com variância robusta tendo como referência os sujeitos controles não expostos ao crack;

Regressão de Poisson ajustada para periodontite e PS do sítio coletado, tendo como referência os sujeitos controles não expostos ao crack;

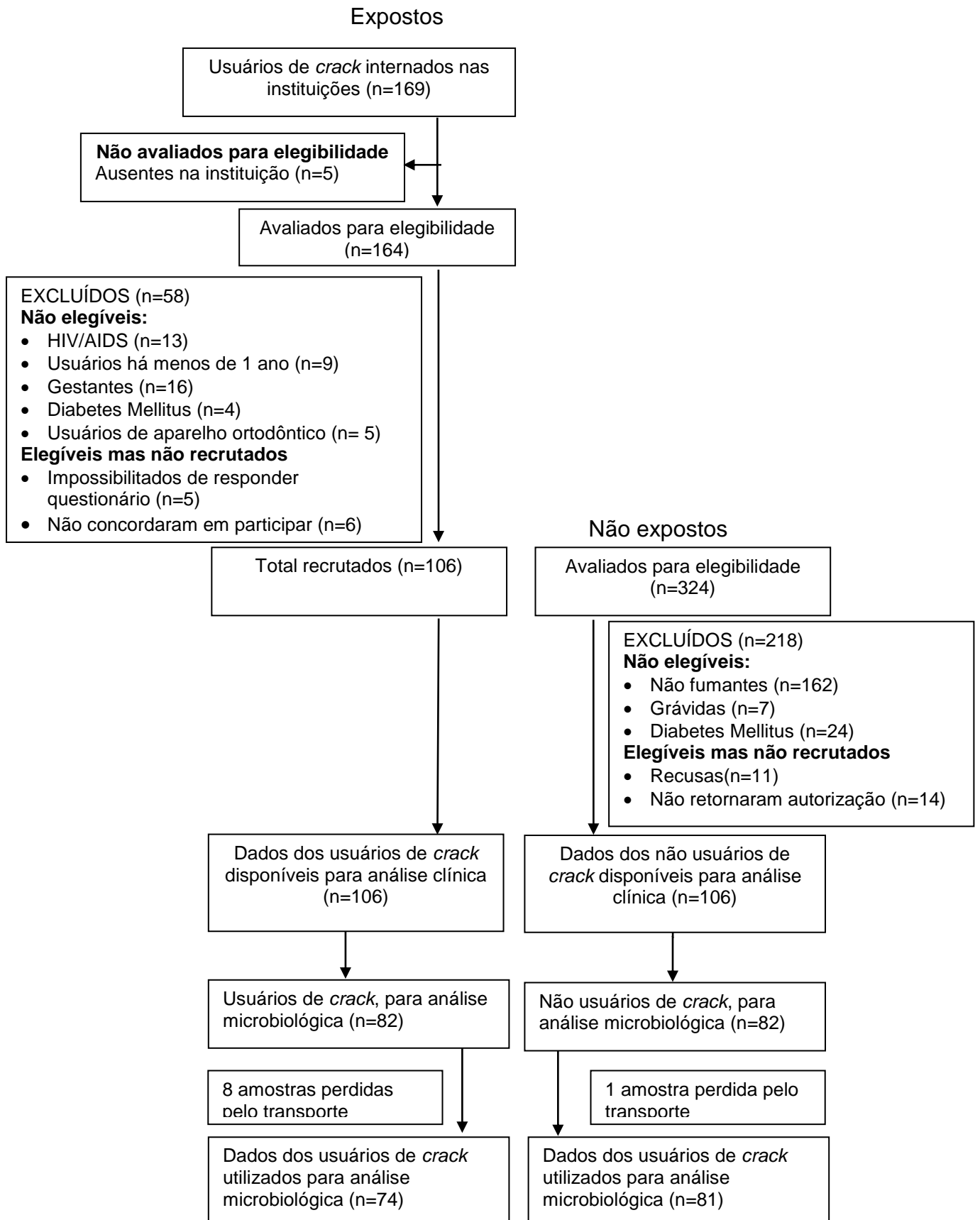


Figura 1 - Fluxograma dos usuários e não usuários de crack.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, maior severidade de perda de inserção foram encontradas em indivíduos expostos ao crack. A plausibilidade biológica para esta associação esta nos efeitos locais, comportamentais e nas alterações das respostas imunológicas. Não foram encontradas diferenças nas quantidades microbiológicas entre os grupos.

Os resultados do presente estudo podem contribuir para o planejamento e implementação de estratégias de prevenção ao uso de drogas. Destacando que, estratégias de abordagem mais amplas para promoção de saúde bucal para estes indivíduos são necessárias.

Para um melhor entendimento das condições periodontais e microbiológicas de indivíduos usuários de crack há a necessidade de mais estudos para confirmar estas hipóteses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANDAR, J. M.; BROWN, L. J.; LÖE, H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.68, n. 10, p. 973-81, oct. 1997.

ALBANDAR, J. M. et al. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 12, p. 1874-81, Dec. 2000.

AL HABASHNEH, R. et al. Association between periodontal disease and osteoporosis in postmenopausal women in Jordan. **The Journal of periodontology**, v. 81, n.11, p. 1613-21, aug. 2012.

ARMITAGE G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-6, Dec. 1999.

ANGELILLO, I. F. et al. Dental health in a group of drug addicts in Italy. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 1, p.36-7, Feb. 1991.

ATIEH, M. A. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 9, p. 1620-9, Sep. 2008.

BALDWIN, G. C. et al. Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. A potential etiology for pulmonary injury. **Chest Journal**, v. 111, n. 3, p. 698-705, Mar. 1997.

BARR, C.; LOPEZ, M. R.; RUA-DOBLES, A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 10, p. 794-801, Nov. 1992.

BOSTRÖM, L. et al. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 3, p. 212-9, Mar. 2001.

CABRAL, G. A. Drugs of abuse, immune modulation, and AIDS. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v.1, n. 3, p. 280-95, Sep. 2006.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: USP, 2005. Disponível em: <<http://www.cebrid.epm.br/index.php>>. Acesso em: 03 dez. 2013.

CHAFFEE, B. W.; WESTON, S. T. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 12, p. 1708-24, Dec. 2010.

CIESIELSKI F. I. N. **Aspectos psicossociais e condições bucais em dependentes químicos internados para desintoxicação**. 2013. 190 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

COLODEL, E. V. et al. Alterações bucais presentes em dependentes químicos. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 1, p. 44-8, 2009.

CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 8, p. 860-6, Aug, 2005.

DARBY, I. B. et al. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 6, p. 417-24, Jun. 2000.

DUAILIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, s. 4, p. 545-57, 2008.

EGGERT, F. M.; MCLEOD, M. H.; FLOWERDEW G. Effects of smoking and treatment status on periodontal bacteria: evidence that smoking influences control of periodontal bacteria at the mucosal surface of the gingival crevice. **Journal of Periodontology**, v.9, n. 72, p. 1210-20, Sep. 2001.

FRIEDLANDER, A. H.; MILLS, M.J. The dental management of the drug-dependent patient. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 60, n. 5, p. 489-92, Nov. 1985.

GARCÍA, L. et al. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis* by multiplex PCR. **Journal of Periodontal Research**, v. 33, n. 1, p. 59-64, Jan. 1998.

GENCO, R. et al. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. **Annals of Periodontology**, v. 1, n. 1, p. 926-32, 1996.

GENCO, R. J. et al. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 7, p. 711-23, Jul. 1999.

GILTHORPE, M. S. et al. Unification of the "burst" and "linear" theories of periodontal disease progression: a multilevel manifestation of the same phenomenon. **Journal Clinical Research**, v.82, n.3, p. 200-5, Mar. 2003.

GORDON, R.J.; LOWY, F.D. Bacterial Infections in Drug Users. **The New England Journal of Medicine**, v. 3. n. 18. p. 1945-54. Nov. 2005

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 5, p. 377-88, May, 2001.

INVERNICI, M. de M. **Avaliação periodontal em usuários de crack**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

JOHNSON, G. K.; HILL, M. Cigarette smoking and the periodontal patient. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 2, p. 196-209, Feb. 2004.

JOHNSON, G. K.; SLACH, N. A. Impact of tobacco use on periodontal status. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 4, p. 313-21, Apr. 2001.

KAPILA, Y.L.; KASHANI, H. Cocaine-associated rapid gingival recession and dental erosion. A case report. **Journal of Periodontology**, v. 68, n. 5, p.485-8, May. 1997.

KAUSHIK, K.S.; KAPILA, K.; PRAHARAJ, A.K. Shooting up: the interface of microbial infections and drug abuse. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 408-22, Apr. 2011.

KLEIN, M. I.; GONÇALVES, R. B. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 6, p. 798-802, Jun. 2003.

LAU, L. et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 12, p. 1061-9, Dec. 2004.

LOESCHE, W. J. et al. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 427-33, Feb. 1992.

MATEOS-MORENO, M. V. et al. Dental profile of a community of recovering drug addicts: Biomedical aspects. Retrospective cohort study. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.1, n. 18, p. 671-9, Jul, 2013.

MICHALOWICZ, B. S. et al. Periodontal findings in adult twins. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 5, p. 293-9, May. 1997.

MITCHELL-LEWIS, D. A. et al. Identifying oral lesions associated with crack cocaine use. **The Journal of American Dental Association**, v. 125, n. 8, p. 1104-8, Aug. 1994.

NONNENMACHER, C. et al. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v.59, n. 1, p. 117-25, Oct. 2004.

PAGE R. C.; KORNAMAN K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**. v. 14, p. 9-11. Jun 1997.

PASTER, B. J. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology 2000**, n. 42, p, 80-7, 2006.

PARRY, J. Mucosal lesions due to oral cocaine use. **British Dental Journal**, v. 22, n. 12. p. 462-4, Jun. 1996.

PELLEGRINO, T.; BAYER, B. M. In vivo effects of cocaine on immune cell function. **Journal of Neuroimmunology**, v. 15, n. 2, p. 139-47, Mar. 1998.

PICOZZI, A. et al. Dental and associated attitudinal aspects of heroin addiction: a pilot study. **Journal of Dental Research**, v. 51, n. 3, p. 869, May-Jun. 1972.

RIBEIRO, E. D. P. et al. Abordagem integrada da saúde bucal de droga-dependentes em processo de recuperação. **Pesquisa Odontologica Brasileira**, v. 16, n. 3. p. 239-45, 2002.

ROSENSTEIN, D. I. Effect of long-term addiction to heroin on oral tissues. **Journal of Public Health Dentistry**, v, 35, n. 2, p. 118-22, 1975.

SALVI, G. E.; CAROLLO-BITTEL, B.; LANG, N. P. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. **Journal of Clinical Periodontology**, n. 35, v. 8 suppl, p. 398-400, Sep. 2008.

SAYAGO C. B. W. **Características de usuários de crack internados em serviços especializados de Porto Alegre**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) –Pontifca Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SCHEIDEGGER, C.; ZIMMERLI, W. Infectious complications in drug addicts: seven-year review of 269 hospitalized narcotics abusers in Switzerland. **Reviews of Infection Diseases**. v. 11, n. 3, p. 486-493. May, Jun. 1989.

SCHEINMANN, R. et al. Non-injection drug use and Hepatitis C Virus: a systematic review. **Drug Alcohol Dependence**, v. 15, n. 1, p. 1-12, Jun. 2007.

SCHEUTZ F. Dental health in a group of drug addicts attending an addiction-clinic. **Community Dentistry Oral Epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 23-8, Feb. 1984.

SLOTS, J.; TING, M. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontology** 2000, v. 20, p. 82-121, Jun 1999.

SHEN, H. M.; KENNEDY, J. L.; OU, D. W. Inhibition of cytokine release by cocaine. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, n. 4, p. 295-300, Apr. 1994.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complex in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, n.2, p.134-44, Feb. 1998.

TAKEUCHI, Y. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 10, p. 1460-9, Oct. 2003.

TEEUW, W. J.; GERDES, V. E.; LOOS, B. G. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 421-7, Feb. 2010.

TONETTI, M. S. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. **Annals of Periodontology**. v. 3, n. 1, p. 88-101, Jul. 1998.

WOLFF, L.; DAHLÉN, G.; AEPPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 5 suppl, May. 1994.

WOOD, R. W. et al. Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 57-66, Jan. 1996.

WOYCEICHOSKI, I E. et al. Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, n. 6, p. 745-9, Jun. 2008.

XIMÉNEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. Sa. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 9, p. 648-57, Sep. 2000.

XIMÉNEZ-FYVIE L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.Sb. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 10, p. 722-32, Oct. 2000.

YUKNA, R. A. Cocaine periodontitis. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 11, n. 1, p. 72-9, 1991.

ZAMBOM, J. J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease, **Journal of Clinical Periodontology**, v.12, n. 1, p. 1-20, Jan. 1985.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Como você sabe o uso de Crack produz graves consequências físicas e emocionais e o aumento de usuários têm trazido crescentes implicações políticas, sanitárias e sociais. Portanto, você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo título é “Condição Bucal de Indivíduos Expostos ao Crack”, que tem por objetivo comparar as condições bucais de pessoas que usam Crack com pessoas não usuário de drogas. Esta pesquisa é importante, porque ainda não se conhece detalhadamente qual (ais) problema(s) bucal (ais) o uso do Crack pode ocasionar.

Assim, esta pesquisa tem por objetivo estudar a condição dos dentes, da gengiva, dos tecidos moles da boca como a bochecha, o céu da boca e a língua e possíveis repercussões destas condições bucais na qualidade de vida de pessoas que usam ou não o Crack.

Para a realização do estudo, será avaliada a cavidade bucal, por meio de um exame clínico, de 78 pessoas que utilizam ou utilizaram crack e 113 pessoas que não utilizam drogas. Os exames que serão realizados não prejudicarão, de nenhuma forma, a saúde dos indivíduos participantes. Entretanto, podem causar um leve desconforto. Ainda, todos os participantes responderão a um questionário sobre questões relacionadas a dados anamnéticos, hábitos e o quanto esses problemas bucais afetam a vida de cada pessoa. O que se espera com o presente estudo é avaliar os prejuízos causados na condição bucal, servindo também como base para o planejamento de tratamentos de indivíduos expostos ao crack, caso sejam detectadas maiores ocorrências de agravos nestes. Além das informações acima citadas, todos os indivíduos participantes da pesquisa receberão por escrito seu diagnóstico bucal e caso necessário, serão encaminhados para atendimento clínico odontológico no curso de Odontologia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), sob a supervisão da Professora Raquel Pippi Antoniazzi.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado(a), de forma clara e

detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima citados.

Fui, igualmente, informado(a):

Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a cerca das avaliações, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

Da liberação de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;

Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;

Do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando.

A pesquisadora responsável por este Projeto de Pesquisa é Raquel Pippi Antoniazzi (55) 81118025

Data da avaliação:_____/_____/_____

Nome do indivíduo

avaliado:_____Assinatura:_____

Representante legal do

Paciente:_____Assinatura:_____

Nome da Pesquisadora: Raquel P. Antoniazzi /

Assinatura:_____

Apêndice C – Estudos Utilizados para Realizar Cálculo Amostral

(Continuação)

	Expostos	Não-expostos	Critério exposição	Critério microbiológico	Bactéria	Técnica de diagnóstico	Autor (ano)
Prevalência 29 exp. 29 não exp. 58 total	68%	28%	Doença periodontal vs Saúde	Presença vs ausência	P. intermedia	PCR Convencional	BONIFÁCIO et al., 2009
Prevalência 10 exp. 10 não exp. 20 total	81%	11%	Doença periodontal vs Saúde	Presença vs ausência	P. gingivalis	PCR Convencional	BONIFÁCIO et al., 2009
Prevalência 33 exp. 33 não exp. 66 total	40%	8%	Doença periodontal vs Saúde	Presença vs ausência	A actinomycetemcomitans	PCR Convencional	BONIFÁCIO et al., 2009
Prevalência 24 exp. 24 não exp. 48 total	51,51%	10%	Doença periodontal agressiva vs Saúde	<10 ⁴ vs >10 ⁴	P. gingivalis	PCR em tempo real	STINGU et al., 2012

	Exposto	Não-exposto	Critério exposição	Critério microbiológico	Bactéria	Técnica de diagnóstico	Autor (ano)
Prevalência 67 exp. 67 não exp. 134 total	30,30%	10%	Doença periodontal agressiva vc Saúde	$<10^4$ vcs $>10^4$	A. actinomycetemcomitans	PCR em tempo real	STINGU et al., 2012
Prevalência 38 exp. 38 não exp. 76	10%	40%	Doença periodontal vc Saúde	10^2 vs 10^{10}	P. gingivalis	PCR em tempo real	MASUNAGA, et al., 2010
Prevalência 38 exp. 38 não exp. 76	60%	90%	Doença periodontal agressiva vc Saúde	10^2 vs 10^9	P. gingivalis	PCR em tempo real	NONNENMACHER, et al. 2005
Prevalência 51 exp. 51 não exp. 102	65%	90%	Doença periodontal agressiva vc Saúde	10^2 vs 10^9	P. intermedia	PCR em tempo real	NONNENMACHER, et al. 2005
Prevalência 68 exp. 68 não exp. 136	77%	95%	Doença periodontal agressiva vc Saúde	10^2 vs 10^9	A. actinomycetemcomitans	PCR em tempo real	NONNENMACHER, et al. 2005

	Exposto	Não-exposto	Critério exposição	Critério microbiológico	Bactéria	Técnica de diagnóstico	Autor (ano)
Prevalencia 38 exp. 38 não exp. 76	10%	40%	Saúde vs Doença Periodontal	Presença vs Ausência	P. gingivalis	PCR Convencional	KLEIN e GONÇALVES, 2003
Prevalencia 26 exp. 26 não exp. 52	14,5%	54,6%	Saúde vs Doença periodontal	Presença vs Ausência	P. gingivalis	PCR Convencional	TANNER, et al., 2007
Prevalência 46 exp. 46 não exp. 92	41,6%	72%	Periodontite Crônica vs Agressiva	Presença vs Ausência	A. actinomicetemco- mitans	PCR Convencional	CORTELLI, et al. 2005
Prevalência 49 exp. 49 não exp. 98	66%	91%	Não Fumante vs Fumante Periodontite agressiva	Presença vcs Ausência	P. intermedia	PCR Convencional	DARBY, et al. 2000
Prevalência 70 exp. 70 não exp. 140	65%	40%	Nunca fumante/fum antes	Semi quantitativo	1 espécie do complexo vermelho	checkboard DNA hibridization	Haffajee e Socransky 2001
Prevalência	odds		Nunca	quantitativo	A.	PCR em tempo	Guglielmetti et al., 2014

26 exp. 26 não exp. 52	ratio: 13.07		fumante/fum antes		actinomycescomitans	real	
Prevalência 371 exp. 371 não exp. 742	40%	30%	Nunca fumante/fum antes	quantitativo	A. actinomycescomitans	PCR em tempo real	Guglielmetti et al., 2014
Prevalência 28 exp. 28 não exp. 56	50.0%	12.5%	Não fumantes/fum antes	Semi quantitativo	F. nucleatum	checkboard DNA hibridization	Bostrom et al., 2000
Prevalência 23 exp. 23 não exp. 46	50.0%	12.5%	Não fumantes/fum antes	Semi quantitativo	P. intermedia	checkboard DNA hibridization	Bostrom et al., 2000
Prevalência 129 exp. 129 não exp. 258	55.6%	37.5%	Não fumantes/fum antes	Semi quantitativo	P. gingivalis	checkboard DNA hibridization	Bostrom et al., 2000
Prevalência 80 exp. 80 não exp. 160	33,3%	13.3%	Não fumantes/fum antes	Quantitativo	A. actinomycescomitans	PCR em tempo real	Bizzarro et al., 2013

Prevalência 20 exp. 20 não exp. 40	86.5%	40.0%	Não fumantes/fum antes	Quantitativo	P. intermedia	PCR em tempo real	Bizzarro et al., 2013
---	-------	-------	------------------------------	--------------	---------------	----------------------	-----------------------

ANEXOS

Anexo A – Entrevista

Entrevista

DATA:

Exposto ao crack: Instituição de tratamento _____

Não exposto ao crack: UNIFRA/ Extramuro

I- IDENTIFICAÇÃO:

Endereço: Rua: _____ N _____ Complemento _____ CEP _____

Telefones para contato fixo ()-()/ celular()-()

Idade: anos Sexo feminino masculino Profissão _____

Raça: Branco Não branco Estado civil _____

II- NÍVEL EDUCACIONAL:

Anos de estudo anos

III- NÍVEL SÓCIO-ECONÔMICO:

Qual a renda da sua família _____ reais

IV- CONSUMO DE DROGAS:

Tempo de internação: _____ dias

Controle

1. Crack

a. Você é ou foi usuário de Crack?

Nunca usou Crack (controles) (pular para a questão 2)

Ex-usuário- Tempo de abstinência do crack: _____ dias

Usuário

b. Que idade você tinha quando experimentou crack pela primeira vez?

Tinha ___ anos

Não lembra

c. De um ano pra cá, ou seja, nos últimos 12 meses você usou crack?

Não

Sim

d. Com que frequência usou crack nos últimos 30 dias antes da internação?

Usou de 1 a 5 dias no mês

Usou de 6 a 19 dias no mês

Usou 20 ou mais dias no mês

Não lembra

e. No dia em que mais usou quantas pedras fumou? _____ pedras

2. Cocaína

f. Você é ou foi usuário de cocaína?

Nunca usou cocaína (pular para questão 3)

Ex-usuário- Tempo de abstinência da cocaína: _____ dias

Usuário

g. Que idade você tinha quando experimentou cocaína pela primeira vez?

Tinha ___ anos

Não lembra

h. De um ano pra cá, ou seja, nos últimos 12 meses você usou cocaína?

3. Outras drogas ilícitas:

Utiliza ou utilizou alguma outra droga ilícita? Qual? Tempo de uso?

SOLVENTES (inalantes) Ex: lança-perfume, loló, cola de sapateiro, benzina, tiner, removedor de tinta, éter, tinta...

Usuários Tempo que utiliza _____ meses; _____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou _____ meses; _____ dias; Tempo de abstinência: _____ meses; _____ dias

MACONHA

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

MERLA

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

HEROÍNA

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

ALUCINÓGENOS Ex: êxtase, ácido, LSD, chá de cogumelo, ketamina, chá de santo daime, dama da noite...

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

ANFETAMINAS (estimulantes); sem orientação médica; Ex: Hipofagin ®, Inibex ®, Dualid ®, Desobesi ®, Anfepriamo, Ritalina...

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

SEDATIVOS (tranqüilizantes, benzodiazepínicos); sem orientação médica; Ex: Diazepam®, Rivotril®, Valium®, Rohypnol®, Lexotan®, outros.

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência: ____ meses; ____ dias

Outras: Qual _____

Usuários Tempo que utiliza ____ meses; ____ dias

Ex-usuário: Tempo que utilizou ____ meses; ____ dias; Tempo de abstinência:
____ meses; ____ dias

4. Tabaco:

- a. Você fuma ou já fumou? Nunca fumou (pular para questão 5) Sim, fumo Sim, parei de fumar (pular para a alternativa "e").
- b. Há quanto tempo você fuma? ____ dias ____ meses
- c. Com que idade você fumou pela 1ª vez na vida? ____ anos
- d. Quantos cigarros você fuma por dia hoje? _____ cigarros/dia
- e. Há quanto tempo você parou de fumar? ____ dias ____ meses
- f. Quantos cigarros por dia você fumava antes de parar _____ cigarros/dia

5. Álcool

a. Você já experimentou alguma bebida alcoólica? Exemplos: cerveja, chopp, vinho, pinga, caipirinha, aperitivos, sidra, outras

Não (pular para a próxima questão, dados médicos)

Sim, bebo ainda

Sim, parei de beber, há quanto tempo não bebe mais: _____ dias; _____ meses

b. Que idade você tinha quando tomou bebida alcoólica pela primeira vez?

____ anos

Não lembra

c. Com que frequência que bebia nos últimos 12 meses?

Não bebi no último ano

Bebi todos os dias

Bebi de 5-6 dias/semana

Bebi de 3-4 dias/semana

Bebi de 1-2 dias/semana

Bebi de 3-4 dias/mês

Bebi de 1-2 dias/mês

Bebi menos que 1 vez/mês

d. Nos últimos 30 dias, quantos dias você bebeu?

__ __ dias

e. Qual é o tipo de bebida alcoólica que você usa ou usou com mais frequência?

cachaça cerveja vinho champanhe Whisky Vodka Tequila Licor

e. Num dia típico em que bebe, quantas doses/copos você bebe?

__ __ doses/copos

f. Que idade você tinha quando passou a beber com regularidade? (pelo menos 1 vez por semana) __ anos

DADOS MÉDICOS

a. Você tem ou teve hepatite Não Sim A B C

b. Você tem AIDS Não Sim ,há quanto tempo __meses; __anos

Se sim, faz tratamento regular Não Sim

c. Você tem Diabetes Não Sim, há quanto tempo __meses; __anos

Se sim, faz tratamento regular Não Sim

d. Você tem alguma doença auto-imune(Artrite reumatóide, síndrome de sjögren, Lúpus,...)

Não Qual _____? Há quanto tempo __meses; __anos?

e. Utiliza alguma medicação regularmente

Não Sim Qual(is). _____

f. Você já havia sido internado por dependência química antes: Não Sim. Qual foi o motivo da sua internação: _____ Há quanto tempo __meses; __anos

DADOS ODONTOLÓGICOS:

a. Quando foi a sua última visita ao dentista? _____meses não lembra nunca visitou

b. Qual o motivo da consulta _____

c. Com que frequência você escova seus dentes? _____

- d. O que você usa para limpar seus dentes? _____
- e. Você faz a limpeza entre os dentes? Não Sim
- f. O que você usa para limpar entre os dentes? _____
- g. Quantas vezes você usa esse instrumento na semana? _____
- h. Você usa algum produto para bochecho? Não Sim.
Qual _____
- i. Quanto tempo geralmente você leva para escovar seus dentes? ____ minutos
- j. Qual o tipo de escova você utiliza: Macia Média Dura
- k. Qual o tipo de dentifrício (pasta de dente) você utiliza? _____
- l. Você nota sangramento nas suas gengivas? Nunca Algumas vezes
Freqüentemente sempre
- m. Você sente sensibilidade nos dentes? Nunca Algumas vezes Freqüentemente
sempre
- n. Você tem as gengivas inchadas? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- o. Você sente mau gosto ou mau hálito na boca? Nunca Algumas vezes
Freqüentemente sempre
- p. Você sente os dentes frouxos? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- q. Você sente secura na boca? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- r. Você sente dificuldade de engolir? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- s. Você sente sensação de queimação na boca? Nunca Algumas vezes
Freqüentemente sempre
- t. Você apresenta úlceras na boca? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- u. Você acha que aplica uma força excessiva para escovar seus dentes?
Não Sim, um pouco de força Sim, muita força
- v. Você ingere alimentos e bebidas ácidas, como frutas cítricas, bebidas gasosas
(refrigerantes), vinagre, vitamina C.? Nunca Algumas vezes Freqüentemente sempre
- w. Você sente dor ou queimação no estômago? Nunca Algumas vezes
Freqüentemente sempre
- x. Você apresenta refluxo gastroesofágico, vômitos recorrentes, anorexia ou
bulimia? Não Sim. Qual _____

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

CENTRO UNIVERSITÁRIO
FRANCISCANO DE SANTA
MARIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da condição bucal de indivíduos expostos ao Crack

Pesquisador: Fabricio Batistin Zanatta

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02451812.6.0000.5308

Instituição Proponente: Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 333.949

Data da Relatoria: 15/07/2013

Apresentação do Projeto:

O crescimento incontrolável do consumo de crack vem chamando a atenção, tanto do poder público, quanto dos órgãos de saúde e sociedade em geral devido ao seu consequente impacto físico e emocional dos usuários, bem como, pelas repercussões políticas, sanitárias e sociais. Neste contexto, observa-se que as evidências disponíveis quanto às consequências do consumo do Crack nas condições estomatognáticas são poucas, na sua maioria séries de casos e com características metodológicas que não permitem conclusões mais precisas. O presente estudo, de delineamento observacional, avalia a condição bucal de indivíduos expostos e não expostos ao crack. Esse projeto já foi avaliado e aprovado por este CEP. Nesta emenda os pesquisadores propõem duas alterações na metodologia. A primeira é em relação ao cálculo amostral e alteração do número de participantes da pesquisa. A justificativa para a alteração da amostra foi a dificuldade de seleção de dois indivíduos controles. Segundo o novo cálculo amostral apresentado, participarão da pesquisa 202 indivíduos, sendo 101 indivíduos expostos ao crack e 101 não expostos. A outra alteração metodológica foi a avaliação do fluxo salivar estimulado que foi incluído na metodologia, para avaliar se os pacientes apresentam hipossalivação.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Comparar as condições bucais de indivíduos expostos e não expostos ao Crack, semelhantes quanto ao sexo, idade e exposição ao tabaco.

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 7º andar
 Bairro: Centro CEP: 97.010-032
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-1200 Fax: (55)3222-6484 E-mail: cep@unifra.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
FRANCISCANO DE SANTA
MARIA**



Continuação do Parecer: 333.949

Objetivos Secundários:

1. Comparar a condição periodontal de indivíduos expostos ao crack a indivíduos controles. 2. Comparar a condição dental e fluxo salivar de indivíduos expostos ao crack a indivíduos controles. 3. Comparar a ocorrência de lesões bucais e o número de células com micronúcleos de indivíduos expostos ao crack a indivíduos controles. 4. Comparar o perfil de algumas bactérias periodontopatogênicas de indivíduos expostos ao crack a indivíduos controles. 5. Verificar possíveis associações entre fatores (sexo, idade, renda, fumo, tempo de exposição ao crack, quantidade de uso do crack) e as condições periodontais encontradas. 6. Avaliar e comparar o impacto da condição oral na qualidade de vida de indivíduos expostos e não expostos ao crack.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Considerando a natureza do estudo praticamente não há riscos de participação. Entretanto, os exames periodontais poderão em indivíduos com baixo limiar de dor, causar um leve desconforto.

Benefícios: Todos os indivíduos participantes da pesquisa receberão, por escrito, o seu diagnóstico bucal e, caso necessário, serão encaminhados para atendimento clínico odontológico no curso de Odontologia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), sob a supervisão da Professora Raquel Pippi Antoniazzi. Além disso, a divulgação dos resultados através da publicação dos mesmos, poderá servir como uma importante evidência para embasar estratégias terapêuticas e alocação de verbas e serviços para o atendimento deste grupo crescente de indivíduos usuários de crack.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto analisado apresenta elementos necessários para o desenvolvimento de uma investigação científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os Termos e documentos preconizados pela Resolução CNS n°466/12, que revisa e revoga a Resolução n. 196/96 CNS/MS.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante o exposto, esse Comitê de Ética em Pesquisa aprova a presente emenda.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 7ª andar
 Bairro: Centro CEP: 97.010-032
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-1200 Fax: (55)3222-6484 E-mail: cep@unifra.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
FRANCISCANO DE SANTA
MARIA



Continuação do Parecer: 333.940

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar relatório final da pesquisa, ao CEP/UNIFRA, via Plataforma Brasil, no mês de fevereiro / 2014, conforme determinação do CONEP.

SANTA MARIA, 15 de Julho de 2013

Assinador por:

Maria do Carmo dos Santos Araujo
(Coordenador)

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 7º andar
Bairro: Centro CEP: 97.010-032
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-1200 Fax: (55)3222-6484 E-mail: cep@unifra.br

Anexo C – Normas da Revista

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Relevant Document: Sample Manuscript

Useful Websites: Submission Site, Articles published in *Journal of Clinical Periodontology*, Author Services, Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell's Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been

independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding

Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from

current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Sources of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's Editorial on Conflict of Interest and Sources of Funding and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

2.6 Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.7 Permissions If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available on the submission site. Further assistance can be obtained from the Editorial Office Assistant, Verity Butler, at cpeedoffice@wiley.com.

3.1. Manuscript Files Accepted

Main manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected). The text file must contain the entire manuscript including title

page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded.

Figure files should be uploaded separately to the main text. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing.

Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.2. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.3. Suggest a Reviewer

Journal of Clinical Periodontology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.5. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your

IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.6 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as “supplementary files for review”.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Journal of Clinical Periodontology publishes **original research articles, reviews, clinical innovation reports** and **case reports**. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

Original Research Articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest

and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. Please refer to English Language Editing Services offered by Wiley at <http://wileyeditingservices.com/en/>.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include:

- Title Page
- Conflict of Interest and Source of Funding
- Clinical Relevance
- Abstract
- Introduction
- Materials and Methods
- Results

- Discussion
- References
- Tables (where appropriate)
- Figure Legends (where appropriate)
- Figures (where appropriate and uploaded as separate files)

All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Title Page: The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

Conflict of Interest and Source of Funding: Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement".

See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper.

For Original Research Articles the abstract should be organized with **aim, materials**

and methods, results and conclusions.

For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice.

It should be structured with the following headings: **scientific rationale for study, principal findings, and practical implications.**

Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

Main Text of **Original Research Articles** should be organized with

- Introduction,
- Materials and Methods,

- Results and Discussion.
- References (Harvard, see section 5.7)

The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

(a) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(b) Statistical Analysis: As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

(c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be

appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by Richard Horton (2002), *The Hidden Research Paper*, *The Journal of the American Medical Association*, 287, 2775-2778). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

Summary of key finding

- * Primary outcome measure(s)
- * Secondary outcome measure(s)
- * Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- * Study Question
- * Study Design
- * Data Collection
- * Analysis
- * Interpretation
- * Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- * Is there a systematic review to refer to?
- * If not, could one be reasonably done here and now?
- * What this study adds to the available evidence
- * Effects on patient care and health policy
- * Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- * For this particular research collaboration
- * Underlying mechanisms
- * Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items

(figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with

- Introduction,
- Clinical Innovation Report,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.5. Case Reports

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with

- Introduction,
- Case report,
- Discussion and Conclusion
- References (see section 5.7)

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with

- Introduction,
- Review of Current Literature,
- Discussion and Conclusion

- References (Harvard, see section 5.7)

5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

Reference style (Harvard): References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966.

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

- a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.
- b) The order of the items in each reference should be:
 - (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
 - (ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.
- c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.
- d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).
- e) The title of the paper should be included without quotation marks.
- f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* 10, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th

edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each

copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600

to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

5.9. Supplementary Material Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'.

Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be

opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

The Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Production Tracking Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with **Wiley-Blackwell's Author Services**.

6.4 Accepted Articles 'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to

differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format.

7. OnlineOpen OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

8. Copyright Assignment If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

