

Aspectos microbiológicos da doença periodontal e sua relação com o consumo de cigarro – uma revisão de literatura

Microbiological aspects of the periodontal disease and their relation to cigarette consumption – a literature review

Rafael Sarkis Onofre¹

Adriana Etges²

João Batista César Neto³

Rogério de Castilho Jacinto⁴

Resumo

O efeito do consumo de cigarro na saúde vem sendo amplamente pesquisado. Na Odontologia vários estudos têm mostrado o impacto desse hábito na doença periodontal. Um dos maiores questionamentos que se faz é se o cigarro afeta a composição da microbióta subgingival de pacientes com problema periodontal. A literatura ainda se apresenta-se muito controversa acerca desse assunto. No entanto acredita-se que o tabaco pode influenciar os fatores de virulência dos microrganismos.

Palavras-chave: periodontite crônica; tabagismo; microbiologia.

Abstract

The effect of tobacco smoking on health has been widely investigated. In dentistry fields, several studies have shown the impact of tobacco in the periodontal disease. One of the biggest questions is whether smoking affects or not the composition of the subgingival microbiota of patients with periodontal problems. The literature demonstrated controversial data about this issue. However it is believed that tobacco can influence the virulence factors of microorganisms.

Key words: periodontal diseases; tobacco; microbiology.

¹Cirurgião-Dentista.

²Professora Doutora, Departamento de Semiologia e Clínica, área de Estomatologia e Patologia Bucal da FO-UFPEL.

³Professor Doutor do Departamento de Estomatologia - Disciplina de Periodontia da FO-USP.

⁴Professor Doutor do Departamento de Semiologia e Clínica – área de Endodontia da FO-UFPEL.

Introdução

O efeito do tabagismo na saúde geral tem sido amplamente discutido na literatura. O hábito de fumar está ligado a um maior risco de doenças cardíacas, vários tipos de câncer e doenças pulmonares (1).

Em Odontologia diversos estudos têm avaliado o impacto do tabagismo sobre a doença periodontal, uma vez que o consumo de cigarros é o principal fator de risco para doença periodontal e os fumantes apresentam maior severidade e incidência desta patologia (2-5). Além disso, apresentam piores resultados após tratamento periodontal mecânico, após regeneração tecidual guiada e altos índices de insucesso após terapia convencional (6-8). Já clinicamente apresentam áreas de sondagem mais profundas e maior perda de inserção e retração gengival (9-13). Porém, apresentam menos gengivite e sangramento à sondagem (13).

Estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes fumantes têm três vezes mais chance de desenvolver doenças periodontais (14). Este hábito tende a causar alterações na constituição da microbiota de bolsas periodontais e interfere na recolonização microbiana em sítios previamente infectados e tratados (3,15-17). No entanto, estudos avaliando o acúmulo de biofilme dental não encontraram diferenças entre a microbiota de fumantes e não-fumantes (10).

A microbiota da doença periodontal é mista, composta principalmente por bactérias anaeróbias estritas. Dentre as centenas de espécies capazes de colonizar a cavidade oral, apenas algumas predominam no biofilme periodontal e parecem estar relacionadas com a patogênese da doença. Espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* são consideradas as principais espécies a colonizarem o biofilme periodontal e participarem da perda tecidual (18). No entanto, outras espécies também podem fazer parte da doença periodontal como: *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens* (19).

Por outro lado, resultados de avaliações qualitativas da composição do biofilme têm sido controversos. Estudos como o de BOSTROM et al. (22) em 2001 usando a metodologia do *checkerboard DNA hybridization* tem mostrado que o cigarro exerce pouco ou nenhuma influência sobre a microflora comumente associada com a doença periodontal. Já estudos como o de Van WINKELHOFF et al. (3) em 2001, onde foi usada a metodologia da cultura anaeróbica foi observado que o

cigarro é um fator determinante na composição da microflora subgengival de pacientes com doença periodontal.

Alguns métodos de identificação de microrganismos patogênicos são muito usados hoje em dia (20-22). O método da cultura anaeróbica ainda se mostra como um dos mais usados, como nos estudos de Van WINKELHOFF et al. (3) em 2001 e BOUTAGA et al. (20) em 2005, e o de QUERIDO et al. (23) em 2006 que usaram tanto o método de cultura como o PCR para identificação de microrganismos patogênicos.

Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre os aspectos microbiológicos da doença periodontal em pacientes fumantes e não fumantes.

Revisão de Literatura

O consumo de cigarro, atualmente, é reconhecido como o principal fator de risco para doença periodontal e está estabelecido que fumantes apresentam maior severidade e incidência dessa patologia (5,24)

Os fumantes podem apresentar algumas modificações dos parâmetros clínicos em relação aos não fumantes. Em um estudo realizado no ano de 2002 por CALSINA et al. (4), constatou-se que os fumantes apresentavam maior perda de inserção, maior profundidade de sondagem e maior recessão gengival, no entanto, não houve diferença entre os índices de placa. Esses resultados são também relatados no trabalho de HAFFAJEE e SOCRANSKY (13), que descreve uma maior perda de inserção na região palatina da maxila e nos incisivos inferiores. No entanto, PREBER, KANT e BERGSTRÖM (25) analisando jovens soldados, constataram que não houve diferença estatística entre a média de profundidade de sondagem em indivíduos tabagistas e não tabagistas.

CALSINA et al. (4), relatam que o efeito do cigarro no osso alveolar está relacionado com o número de cigarros consumidos por dia e a duração desse hábito. Também afirma que o efeito do cigarro no osso alveolar é mais pronunciado em homens que em mulheres.

Outro aspecto importante é o efeito do tabaco no sangramento gengival, DIETRICH, BERNIMOULIN e GLYNN (26) e SHIMAZAKI et al. (27) concluíram que o consumo do tabaco tem um efeito supressor ao sangramento gengival.

HABER (28) descreveu uma doença específica do tabaco – periodontite relacionada ao tabaco – que se caracterizava por uma gengiva fibrótica, inflamada e edemaciada não proporcional à severidade da doença, maior presença de bol-

sas periodontais nas faces vestibulares dos dentes anteriores da maxila, recessão gengival na região anterior e a gravidade das lesões não estaria associada à má higiene oral.

Em relação à resposta do hospedeiro, diversos estudos nos levam a crer que pacientes fumantes apresentam uma resposta deficiente em relação a não fumantes. O consumo de cigarro está relacionado a um maior número de neutrófilos na circulação periférica, porém esses neutrófilos possuem sua função prejudicada com uma menor quimiotaxia, fagocitose e aderência (29, 30).

Concomitante a isso, ocorre uma redução crônica do fluxo sanguíneo, efeitos negativos sobre as citocinas e a produção de fatores de crescimento, inibição do crescimento de fibroblastos e produção de colágeno e um aumento do potencial dos patógenos periodontais (13, 31-36).

Os fumantes também apresentam uma resposta menos expressiva quando submetidos a tratamentos periodontais – não cirúrgico, cirúrgico periodontal básico, cirúrgico periodontal regenerativo e cirúrgico periodontal plástico - incluindo uma menor redução nas profundidades de sondagem, ganho de inserção clínica e uma maior demora na revascularização, reepitelização, reinserção de tecido conjuntivo e cementogênese nos casos de tratamento cirúrgico (37-44).

A perda de suporte periodontal é resultado da interação entre fatores genéticos, ambientais, bacterianos e do próprio hospedeiro (45). Como influência bacteriana, alguns microrganismos apresentam papel importante nessa perda tecidual como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *B. forsythus*, e ainda outros microrganismos de provável significância como *P. intermedia*, *Campylobacter rectus*, *P. micra*, *Fusobacterium* sp., *Treponema* sp., *Estafilococos*, *Enterococos*, *Pseudomonas* e vários bastonetes (46).

Alguns trabalhos têm mostrado que a presença de espécies bacterianas de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* estão associadas com a progressão das lesões periodontais (47,48).

MAYORGA-FAYAD et al. (49), em um estudo que avaliou uma população colombiana concluiu que além da *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* / *P. nigrescens*, *C. rectus*, *Fusobacterium spp* e *E. corrodens* também constituem parte importante do perfil microbiológico das periodontites e, conclui também que em periodontites agressivas a *P. gingivalis* foi encontrada mais frequentemente que a *A. actinomycetemcomitans*.

QUERIDO et al. (23), em um estudo que avaliou aspectos clínicos, radiográficos e microbianos de uma família com expressiva prevalência de doença periodontal observaram grande quanti-

dade de *A. actinomycetemcomitans* usando tanto método de cultura quanto o método de PCR e concluíram que os indivíduos apresentavam mesmo perfil microbiano, porém, apresentavam severidade e expressão da doença de modo diferente, levando a crer que outros fatores poderiam estar atuando e modificando a manifestação dessa doença.

SOCRANSKY et al.(48) tentaram definir, através do teste *DNA-DNA checkerboard* e sondas de DNA genômico, quais comunidades bacterianas faziam parte da composição da placa subgengival. Foram consistentemente observados 5 grandes complexos: Complexo Vermelho, relacionado com *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *Treponema denticola*, o Complexo Laranja, dividido em 2 grupos, um incluía as espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodoniicum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. micra* e o outro grupo incluía *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*. O Complexo Amarelo consistiu de *Streptococcus sanguis*. *S. oralis*, *S. mitis*. *S. gordonii* e *S. intermedius*. O Complexo Verde foi composto das bactérias *Capnocytophaga species*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo A. O complexo Roxo consistiu nas seguintes bactérias *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. O estudo concluiu que há pouca relação entre os 5 grandes complexos, no entanto, notavelmente o Complexo Vermelho está relacionado com as medidas clínicas da doença periodontal, principalmente profundidade de bolsa periodontal e sangramento à sondagem.

Um dos fatores que parecem modificar parâmetros clínicos e microbiológicos da doença periodontal é o consumo de cigarro (4,49). No entanto, os estudos já mostram que essa alteração microbiológica pode ocorrer mesmo antes do desenvolvimento da doença como mostra o trabalho de SHILOAH, PATTERS e WARING (50) que avaliaram a prevalência de periodontopatógenos em adultos jovens fumantes e sem doença periodontal e concluíram que indivíduos que possuem história de mais de 5 anos de tabagismo possuem 18 vezes mais chances de ser infectado por bactéria periodontopatogênicas do que pacientes saudáveis e não fumantes o que pode representar um risco significativo para o desenvolvimento de doença periodontal no futuro.

No quesito doença periodontal já estabelecida, Van WINKELHOFF et al. (3), usando a cultura de microrganismos detectaram que pacientes fumantes e sem tratamento periodontal possuíam como características microbiológicas uma maior prevalência de *P. intermedia* *nigrescens* e níveis médios de *P. micra* e *F. nucleatum*. Já os pacientes

fumantes e que haviam recebido terapia periodontal se caracterizaram por elevados índices de *T. forsythia*, *P. micra* e *cons-Campylobacters* e níveis médios de *F. nucleatum*. Os autores concluíram nesse estudo que o tabagismo é fator decisivo para a composição da microbiota subgengival em pacientes com periodontite.

Já, HAFFAJEE e SOCRANSKY (13), avaliaram através do teste DNA-DNA *checkerboard* a prevalência, proporção e os níveis das espécies subgengivais em indivíduos adultos fumantes, ex-fumantes e não fumantes. As espécies de bactérias *E. nodatum*, *F. vincentii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram significativamente mais prevalentes no grupo dos fumantes do que nos outros 2 grupos, levando os pesquisadores a conclusão que a maior diferença em pacientes com história de tabagismo está na prevalência de espécies e não na contagem ou proporção.

No entanto, alguns estudos afirmam que o cigarro tem pouca ou nenhuma influência na microbiota subgengival associada a periodontite crônica (21,22). NATTO et al. (21), avaliaram através do teste DNA-DNA *checkerboard* a microbiota subgengival de uma população da Arábia Saudita de pacientes fumantes de cigarro, fumantes de cachimbo e não fumantes. Os microrganismos pesquisados foram: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *P. micra*, *C. rectus*, *E. corrodens*. A conclusão dos pesquisadores foi que não há diferença significativa entre os 3 grupos quanto à ocorrência dos microrganismos estudados sugerindo que o fumo não altera as características da microbiota subgengival. Já, BOSTRÖM et al. (22) avaliaram através do teste DNA-DNA *checkerboard* a influência do cigarro na microbiota subgengival de pacientes com periodontite crônica e após analisarem a presença dos 12 periodontopatógenos considerados clássicos na doença periodontal concluíram que o tabagismo exerce pouca ou nenhuma influência sobre a ocorrência subgengival dessas bactérias em pacientes com periodontite moderada e severa.

Discussão

A periodontite crônica é a patologia que mais acomete os tecidos periodontais, sendo mais comumente encontrada em indivíduos adultos (51). Clinicamente os pacientes podem apresentar perda de inserção conjuntiva, perda óssea alveolar, formação de bolsa periodontal e inflamação gengival (52). O grau de destruição tecidual é proporcional a presença de fatores locais como a

presença de cálculo subgengival e de diferentes espécies bacterianas (23).

As doenças periodontais são influenciadas por condições como características do indivíduo, fatores sociais e comportamentais e condições sistêmicas do paciente (2). O consumo de cigarro é o principal fator de risco da doença periodontal (1). Além disso, está comprovado que fumantes apresentam maior severidade e incidência dessa patologia (5,23).

Estudos como os CALSINA, RAMÓ'N e ECHEVERRÍA (4) de HAFFAJEE e SOCRANSKY (13), mostraram que pacientes fumantes possuem mudanças nos parâmetros clínicos, incluindo maior perda de inserção, maior profundidade de sondagem e maior recessão gengival. No entanto, PREBER, KANT e BERGSTRÖM (25), mostraram não haver diferença estatística entre a média de profundidade de sondagem e perda óssea em pacientes jovens fumantes e não fumantes, porém, os fumantes apresentaram maior índice de placa e sangramento gengival.

A microbiota subgengival de bolsas periodontais profundas caracteriza-se pela presença de Bastonetes Gram-negativos anaeróbios e espiroquetas (53,54). Espécies como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T.forsythia*, *P. intermedia* e *P. micra* são consideradas fortes marcadores da periodontite em adultos além de estarem associados à progressão da doença (18). Estudos como o de SOCRANSKY et al, (48) em 1998, tem mostrado que espécies como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia/nigrescens*, *E. corrodens*, *C. rectus* e *T. denticola* são mais freqüentemente encontrados em biofilmes de indivíduos periodontalmente comprometidos do que em indivíduos saudáveis. Esses relatos confirmam a natureza polimicrobiana da doença periodontal.

No que se refere ao perfil microbiológico das bolsas periodontais de fumantes e não fumantes os resultados dos estudos ainda se mostram conflitantes. Trabalhos como o de BOSTROM et al. (22) e NATTO et al. (21), não encontraram diferenças na composição da microbiota. Por outro lado, alguns estudos como o de HAFFAJEE e SOCRANSKY (13) e ZAMBON et al (15) sugerem que o tabaco leva a uma alteração no biofilme subgengival (13,15). O estudo de NATTO et al. (21) avaliou 198 indivíduos, incluindo fumantes de cigarro, fumantes de cachimbo de água e não fumantes, o estudo de BOSTROM et al. (22) avaliou uma amostragem menor, 64, apenas de pacientes fumantes de cigarro e não fumantes e ambos utilizaram a metodologia do DNA-DNA *checkerboard*. Já, o estudo de HAFFAJEE E SOCRANSKY (13) avaliou também através do DNA-DNA *checkerboard*, 272 pacientes incluindo não fumantes, fu-

mantes e ex-fumantes e ZAMBON et al. (15) em 1996 avaliou 798 indivíduos, incluindo fumantes e ex-fumantes usando a metodologia da microscopia de imunofluorescência. A utilização de diferentes metodologias e as diferenças amostrais das populações investigadas podem explicar a dificuldade de comparar os trabalhos encontrados e os resultados conflituosos que a literatura ainda apresenta

Além disso, a literatura ainda apresenta poucos resultados sobre a influência do cigarro pontualmente em cada espécie de bactéria, o que dificulta o entendimento da relação cigarro/bactéria/doença periodontal. A espécie *P. gingivalis*, um dos principais marcadores da doença periodontal, acaba se tornando um dos principais marcadores em fumantes também, pois quando exposta ao cigarro apresentou alterações na interação com o hospedeiro (55) e, além disso, TEIXEIRA et al. (56) quantificaram através da metodologia do RT-PCR, a presença dessa espécie e de alguns de seus genótipos em pacientes fumantes acometidos por periodontite crônica e mostraram que em todas as amostras havia a presença da espécie *P. gingivalis* e concluíram que há uma associação entre a *P. gingivalis* genótipo fimA IV e a severidade da doença periodontal em fumantes.

Conclusão

Apesar da literatura se mostrar ainda controversa sobre a influência do cigarro na microbiota de pacientes fumantes e não fumantes com doença periodontal crônica, cepas presentes no ambiente subgingival podem sofrer influências pontuais do cigarro e influenciar na progressão da doença. Além disso, fumantes apresentam uma resposta tecidual diminuída, levando a uma evolução mais rápida da doença, e uma resposta imunológica deficiente, dificultando a resposta à terapia periodontal.

Referências Bibliográficas

1. WHO (World Health Organization) Tobacco Free Initiative. [on line] Url: "http://www.who.int/tobacco/en". 2005
2. Georgia JK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol.* 2007; 44:178-194.
3. Van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol.* 2001 May;72(5):666-71.
4. Calsina G, Ramón J-M, Echeverría J-J: Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 771-776
5. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis

- in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2000 May; 71(5):743-51.
6. Trombelli L, Cho KS, Kim CK, Scapoli C, Scabbia A. Impaired healing response of periodontal furcation defects following flap debridement surgery in smokers. A controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2003 Jan;30(1):81-7.
7. Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, Taylor M, Padgett P, Jung J, Clark WB. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1994 Oct;21(9):628-37. Erratum in: *J Clin Periodontol* 1995 Feb;22(2):183.
8. MAGNUSSON I, WALKER CB. Magnusson I, Walker CB. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:289-92.
9. Bergstrom, J, Eliasson, S. (1987) Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontol Res.* 1987; 22:513-517
10. Bergstrom J, Eliasson S, Dock J .A 10 – year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol.* 2000; 71:1338-1347
11. Grossi SG, Zambon JJ, Ho A.W, et al Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65:260-267
12. Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. . *J Periodontol.* 1994; 65:718-723
13. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001; 28:283-295
14. Johnson GK, Hill M, Cigarette Smoking and the periodontal patient. *J Periodontol.* 2004; 75:196-209.
15. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford, R, Genco R.J. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1996; 67:1050-1054.
16. Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res.* 2009;88(6): 524-528.
17. Delima SL, McBride RK, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *J Clin Microbiol* 2010; Jul;48(7):2344-9
18. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 1999; 20:82-121.
19. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2004; 59:117- 125
20. Boutaga K, Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 45:191-199.
21. Natto S, Baljoon M, Dahle'n G, Bergstro'm J. Tobacco smoking and periodontal microflora in a Saudi Arabian population. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 549-555.
22. Boström L, Bergström J, Dahle'N G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:212-219.

23. Querido SMR, Dotto PP, Aquino DR, Cortelli JR. Aspectos clínicos, radioGRÁFICOS e microbianos de uma família com expressiva prevalência de doença periodontal Rev. Odonto Cienc. – Fac. Odonto/PUCRS,2006; 21:52.
24. Kerdvongbundit V, Wikesjo UM. Prevalence and severity of periodontal disease at mandibular molar teeth in smokers with regular oral hygiene habits. J Periodontol. 2002; 73(7): 735-40.
25. Preber H, Kant T, Bergström J. Cigarette smoking, oral hygiene and periodontal health in Swedish army conscripts. J Clin Periodontol 1980; 7:106-113.
26. Dietrich T, Bernimoulin JP, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. J Periodontol. 2004; 75: 16–22.
27. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. The influence of current and former smoking on gingival bleeding: the Hisayama study. J Periodontol. 2006; 77:1430-1435.
28. Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. Curr Opin Periodontol, 1994;12-8.
29. Noble RC, Penny BB. Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. Infect Immun. 1975 Sep;12(3):550-5.
30. MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. J Periodontol. 1992 Nov;63(11):908-13
31. Morozumi T, Kubota T, Sugita N, Itagaki M, Yoshie H. Alterations of gene expression in human neutrophils induced by smoking cessation. J Clin Periodontol 2004; 31:1110-1116.
32. Nair P, Sutherland G, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA. Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. J Clin Periodontol 2003; 30: 435–437.
33. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol 2003; 30: 145–153.
34. Ryder MI, Saghizadeh M, Ding Y, Nguyen N, Soskolne A. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta from peripheral blood mononuclear cells. Oral Microbiol Immunol. 2002 Dec; 17(6):331-6
35. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. J Periodontal Res. 2002; 37: 279–285.
36. Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. J Clin Periodontol 2002; 29:763–770
37. Preber H, Bergstrom J. The effect of non-surgical treatment in periodontal pockets in smokers and non-smokers. J Clin Periodontol. 1986; 13: 319-323.
38. Miller PD. Root coverage whit free gingival grafts. Factors associated whit incomplete coverage. J Periodontol. 1987; 64:1075-1078.
39. Grossi SG, Skrepinski FB, Decaro T, Zambon JJ, Cummin D, GENCO R.J. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. J Periodontol. 1996; 67: 1094-1102.
40. Boström L, Bergström J, Linder LE. Influence smoking othe outcome of periodontal surgery. A 5 year follow-up. J Clin Periodontol. 1998; 25:194-201.
41. Biddle A, Palmer RM, Wilson RF, Watts TLP. Comparison of periodontal probing measurements in smokers and non-smokers. J Clin Periodontol. 2001; 806-812.
42. Raulin LA, McPherson JC, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. J Periodontol. 1988; 59: 318-325
43. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 1995; 66:1056-1064.
44. James JA, Sayers NS, Druker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment ad growth of periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol.1999; 70: 518-525.
45. Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol. 1997; 24:72-77.
46. SLOTS J. Slots J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. J Periodontol Res. 35:108-114, 2000
47. Papapanou P, Madianos P, Dahle'N G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. Eur J Oral Sci. 1997; 105:389-396.
48. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JR.; Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134-144.
49. Gomes ,SC Piccnin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher Cl, Mutters R, Marcantonio RAC. Periodontal Status in Smokers and Never-Smokers: Clinical Findings and Real-Time Polymerase Chain Reaction Quantification of Putative Periodontal Pathogens. J Periodontol. 2006; 1483-1490.
50. Shiloah S, Patters MR, Waring MB. The prevalence of pathogenic periodontal microflorain healthy young adult smokers. J Periodontol. 2000; 562-567.
51. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. American Academy of Periodontology. Ann Periodontol.1999; 4(1):18-19;38-53.
52. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab. Invest. 1976; 33: 235-49.
53. --Haffaje AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5:78–111.
54. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol. 1979; 6: 351-382.
55. Bagaitkar J, Williams LR, Renaud DE, Bemakanakere MR, Martin M, Scott DA, Demuth DR. Tobacco-induced alterations to *Porphyromonas gingivalis*-host interactions. Environ Microbiol. 2009; 11: 1242–53.
56. Teixeira SRL, Mattarazo F, Feres M, FIGURAUeiredo LC, de Faveri M, Simionato MRL, Mayer MPA. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2009; 36: 482–7.