

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

**Bacteriemias tras el tratamiento periodontal básico en
pacientes con enfermedades cardiovasculares.**

Por:
Eddy Shan Bai

Tutora:
Dra. Elena Figuero Ruiz

Madrid, septiembre de 2020



MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Eddy Shan Bai

TUTOR/ES DEL TFM: Elena Figuro Ruiz

TÍTULO DEL TFM: Bacteriemias tras el tratamiento periodontal básico en pacientes con enfermedades cardiovasculares.

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: Julio 2019

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del



tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.


La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 1 de Septiembre de 2020

<p>El estudiante de Máster</p>  <p>Fdo.: Eddy Shan Bai</p>	<p>El Tutor/es</p> <p>Firmado por FIGUERO RUIZ ELENA - DNI 71103286M el día 01/09/2020 con un certificado emitido por AC Administración Pública</p> <p>Fdo.: Elena Figuero Ruiz</p>
--	---

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Eddy Shan Bai
_____ con NIF 51463473F, estudiante
de Máster en la Facultad de
Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2019 –
2020, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado Bacteriemias tras el tratamiento
periodontal básico en pacientes con enfermedades cardiovasculares.

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

Elena Figuero Ruiz

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 1 _____ de Septiembre _____ de 2020



Fdo.: Eddy Shan Bai

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MÁSTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:

Elena Figuro Ruiz

del alumno/a

Nombre y apellidos

Eddy Shan Bai

encuadrado en la línea de investigación

Eficacia de intervenciones para el tratamiento de enfermedades periodontales y peri-implantarias

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Bacteriemia tras el tratamiento periodontal básico en pacientes con enfermedades cardiovasculares.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En _____ Madrid _____, a 1 de Septiembre de 2020.

Fdo: el profesor/a

Firmado por FIGUERO
RUIZ ELENA - DNI
71103286M el día
01/09/2020 con un
certificado emitido
por AC Administración

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi infinito agradecimiento a mi tutora, la Prof. Elena Figuera, por su tiempo y dedicación, por permitirme, otro año más, seguir aprendiendo bajo su tutela, por su inestimable ayuda en la realización de este trabajo, su paciencia para resolver mis dudas y su apoyo y guía durante estos últimos años. Siempre serás un referente para mí.

A Ana Molina, Nagore Ambrosio y Eduardo Montero, quienes me han formado y enseñado cada uno de los pasos para llevar a cabo esta investigación y sin los que la realización de este trabajo no habría sido posible. Agradecerles todo el tiempo que han dedicado, así como los consejos, conocimientos y experiencia que me han transmitido.

Al equipo del Laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, por su inmensa ayuda en el análisis de los resultados.

Sin duda, esta etapa no habría sido igual sin el apoyo de mis compañeros y amigos del Máster de Ciencias Odontológicas, especialmente a Rocío, Solange, Florencia y Pablo, por todo el tiempo compartido este último año, por permitirme aprender de vosotros y con vosotros y hacerme crecer como persona. A mis compañeros del Título de Experto en Clínica Periodontal, en especial a Paula y Rocío, por su cariño, por haberme apoyado y motivado siempre a seguir hacia delante, incluso en los momentos más complicados.

Por último, a mis amigos y familia, por su apoyo incondicional en cada proyecto nuevo que me propongo. Os estaré siempre agradecido.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Periodontitis	1
1.1.1. Etiopatogenia de la periodontitis	1
1.1.2. Tratamiento de la periodontitis	3
1.1.3. Periodontitis y bacteriemias	4
1.2. Enfermedades cardiovasculares	7
1.2.1. Etiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares	7
1.2.2. Tratamiento de las enfermedades cardiovasculares	9
1.3. Asociación periodontitis y enfermedades cardiovasculares	10
1.3.1. Plausibilidad biológica	10
1.3.2. Evidencia epidemiológica	12
1.3.3. Estudios de intervención	13
1.4. Justificación	15
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	17
4. Material y métodos	18
4.1. Diseño del estudio	18
4.2. Selección de la muestra	18
4.3. Cálculo del tamaño muestral	19
4.4. Aleatorización y ocultación de la asignación	19
4.5. Enmascaramiento	19
4.6. Intervención	20
4.7. Extracción de datos	21
4.8. Análisis microbiológico	23
4.9. Análisis estadístico	26
5. Resultados	28
5.1. Descripción de la muestra	28
5.2. Variables clínicas periodontales	28
5.3. Variables microbiológicas periodontales	29
5.4. Bacteriemia	31
5.5. Correlación entre recuentos subgingivales y recuentos en sangre	32

6. Discusión	33
6.1. Resumen de la evidencia	33
6.2. Fortalezas del estudio	35
6.3. Limitaciones	36
6.4. Líneas futuras de investigación	37
6.5. Conclusiones	38
7. Bibliografía	39

Resumen

Objetivo: Evaluar los efectos del raspado y alisado radicular sobre la frecuencia de bacteriemia en comparación con la profilaxis supragingival en pacientes con periodontitis estadios III o IV y enfermedad cardiovascular establecida.

Material y métodos: Se realiza un ensayo clínico controlado y aleatorizado con diseño paralelo en una muestra de pacientes procedentes del Hospital Universitario Severo Ochoa. El grupo test recibió raspado y alisado radicular, mientras que el grupo control recibió profilaxis supragingival. Se evaluó la frecuencia de bacteriemia antes y durante el tratamiento, a los 3 y 10 minutos de su inicio, mediante técnicas de cultivo anaerobio directo (CAD) y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR), para la detección de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. La frecuencia de bacteriemia se comparó entre ambos grupos mediante test de Chi cuadrado.

Resultados: Se presentan los resultados de una submuestra de 25 pacientes, 14 pertenecientes al grupo control y 11 al grupo test. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros basales demográficos, clínicos o microbiológicos periodontales entre los grupos. El empleo de CAD no logró detectar bacteriemia en ninguno de los grupos. La frecuencia basal de *P. gingivalis*, medida mediante qPCR, fue de 7,10% en el grupo control y 27,30% en el grupo test ($p = 0,288$). La prevalencia basal de *A. actinomycetemcomitans* fue de 0% en el grupo control y 9,10% en el grupo test ($p = 0,440$). A los 10 minutos de tratamiento, *P. gingivalis* se encontró en 0% del grupo control y 27,30% del grupo test ($p = 0,072$); mientras que *A. actinomycetemcomitans* solo se encontró en 9,10% del grupo test ($p = 0,440$).

Conclusión: En este grupo de pacientes, el raspado y alisado radicular no aumenta de manera significativa la frecuencia de bacteriemia en pacientes con periodontitis estadio III y IV y enfermedad cardiovascular establecida.

1. Introducción

1.1. Periodontitis

Las enfermedades periodontales comprenden un grupo de enfermedades crónicas inflamatorias que afectan a los tejidos de soporte de los dientes, que pueden resultar en pérdida dentaria y contribuir a la inflamación sistémica (Kinane et al., 2017).

Según el *Workshop Mundial para la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Peri-implantarias* de 2017, se define la periodontitis como una enfermedad inflamatoria crónica de etiología multifactorial, que se asocia a la disbiosis de la microbiota oral y se caracteriza por una destrucción progresiva del periodonto, siendo su consecuencia final la pérdida dentaria (Papapanou et al., 2018). Se clasifica mediante un sistema de estadios y grados: los estadios (estadio I-IV) indican la gravedad de la enfermedad y la complejidad del tratamiento, mientras que los grados (grado A-C) permiten establecer el riesgo de progresión de la enfermedad (Papapanou et al., 2018). La extensión indica el porcentaje de dientes afectados con el estadio que caracteriza al paciente (generalizado, localizado o patrón incisivo-molar) (Sanz et al., 2020c).

En cuanto a su prevalencia, a pesar de las dificultades para realizar comparaciones debido a la heterogeneidad metodológica y en la definición de caso empleada en los estudios disponibles, en el *Global Burden of Disease 2017 Study*, se estimó una prevalencia global de 9,8% para periodontitis severa (Bernabe et al., 2020). A nivel nacional, Carasol y colaboradores reportaron en 2016 una prevalencia en España de 38,4% entre la población trabajadora (Carasol et al., 2016).

1.1.1. Etiopatogenia de la periodontitis

La periodontitis se produce como resultado de una disbiosis, entendida como una alteración en la composición de la comunidad microbiana asociada a salud, generando una disrupción de las interacciones beneficiosas con el hospedador y resultando perjudicial para su salud (Sanz et al., 2017). Esta disbiosis puede desencadenarse a causa de alteraciones en la inmunidad local, un aumento en la disponibilidad de nutrientes y representa la diversidad de microambientes presentes en la bolsa periodontal.

En el aspecto microbiológico, la etiología de la periodontitis comenzó entendiéndose como el resultado de diferencias cuantitativas en el *biofilm* dental, esta hipótesis sería conocida como “hipótesis de la placa inespecífica” (Theilade, 1986). El desarrollo de técnicas de detección e identificación microbiológicas más avanzadas permitió la caracterización de nuevos microorganismos orales y su estudio en complejos asociados a la enfermedad, de esta manera, especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre otras, fueron identificadas como patógenos periodontales (Socransky et al., 2002). Sin embargo, estos microorganismos se encuentran también en individuos sanos y, en los últimos años, nuevas especies han sido asociadas a la enfermedad. Los conocimientos actuales sobre la microbiología de la periodontitis contemplan la posibilidad de que especies como *P. gingivalis* sean “especies clave” para la alteración de la homeostasis microbiana (Hajishengallis and Lamont, 2012). Estas especies, a pesar de encontrarse en baja abundancia en la bolsa periodontal, pueden desencadenar una enfermedad inflamatoria alterando la microbiota oral comensal a un estado disbiótico (Hajishengallis et al., 2012). *Porphyromonas gingivalis* es capaz de alterar la inmunidad innata favoreciendo el crecimiento y desarrollo del *biofilm* y generando cambios destructivos en la interacción microorganismo-hospedador (Figura 1).

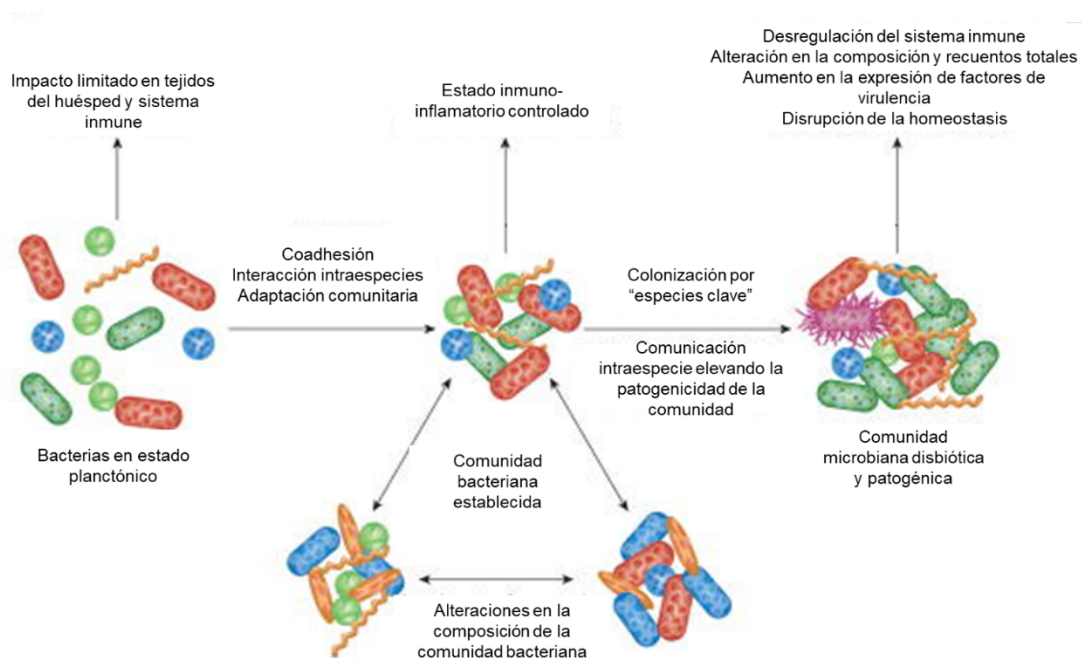


Figura 1. Modelo de sinergia polimicrobiana y disbiótica en la etiología de las enfermedades periodontales. Adaptado de (Lamont and Hajishengallis, 2015)

Sin embargo, la presencia de estas bacterias es necesaria, pero no suficiente para

el desarrollo de la enfermedad. La respuesta del huésped a la agresión bacteriana tiene una finalidad protectora y consiste en la secreción de mediadores proinflamatorios, como citoquinas (interleuquina [IL]-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α], prostaglandina E₂ [PGE₂] y metaloproteinasas de la matriz [MMP]), que serán las principales responsables de la destrucción tisular (Cekici et al., 2014; Kornman, 2008).

La respuesta inmunitaria e inflamatoria comenzará entre 2 y 4 días tras el comienzo de la acumulación de *biofilm* dental. La lesión estará inicialmente caracterizada por la presencia de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y a medida que avance la lesión y se mantenga el desafío bacteriano, la lesión pasará a ser dominada por linfocitos B y células plasmáticas. Las interacciones entre estas estirpes celulares darán lugar a la producción y secreción de mediadores proinflamatorios y anticuerpos y a la fagocitosis de las bacterias y productos bacterianos invasores. Además, la respuesta inflamatoria puede verse modificada por diversos factores genéticos (polimorfismos de un solo nucleótido [SNP] o enfermedades hereditarias) y ambientales (tabaquismo, enfermedades adquiridas, etc.) (Cekici et al., 2014; Kornman, 2008).

1.1.2. Tratamiento de la periodontitis

El tratamiento de la periodontitis tiene como objetivo la prevención de la progresión de la enfermedad, la minimización de los síntomas, la posibilidad de restaurar los tejidos perdidos y el mantenimiento de la salud periodontal (Graziani et al., 2017). Para ello, se emplea la combinación de diferentes técnicas terapéuticas como: instrucciones de higiene oral, instrumentación mecánica, farmacoterapia local o sistémica y diversos tipos de cirugía. Con ello, se consigue la eliminación del *biofilm* subgingival y el restablecimiento de un entorno y microflora compatibles con salud periodontal.

Parámetros como el nivel de inserción clínica (NIC), la profundidad de bolsa al sondaje (PS) y el sangrado al sondaje (SS), se emplean frecuentemente para valorar el estado periodontal, así como la respuesta al tratamiento (Papapanou et al., 2018).

Sanz y colaboradores, en 2020, establecen una guía clínica para el tratamiento de la periodontitis estadio I a III, dividiendo el proceso en cuatro fases (Sanz et al., 2020b)

1. Fase de *modificación del comportamiento del paciente*, con el objetivo de conseguir un adecuado control del *biofilm* supragingival y controlar los factores

de riesgo individuales. Esta fase incluye: control del *biofilm* dental supragingival (por el paciente), intervenciones para mejorar la efectividad en la higiene oral (instrucciones de higiene oral, motivación), terapias coadyuvantes, instrumentación profesional supragingival y control de factores de riesgo, como cese del hábito tabáquico, control metabólico en paciente diabéticos, etc.

2. *Fase básica o causal* del tratamiento periodontal, dirigida hacia el control del *biofilm* subgingival y la eliminación de los depósitos de cálculo mediante instrumentación subgingival y el empleo de agentes coadyuvantes sistémicos o locales. Tras esta fase, la respuesta al tratamiento es reevaluada, valorando la consecución del objetivo final del tratamiento o cierre de la bolsa periodontal (PS \leq 4mm y SS negativo). Si el tratamiento es exitoso, el paciente es incluido en un programa de mantenimiento periodontal; en caso contrario, se procede a la siguiente fase del tratamiento.
3. Tratamiento de *localizaciones que no responden al tratamiento básico*, con el objetivo de obtener acceso quirúrgico a la instrumentación subgingival o a la regeneración o resección de aquellas lesiones que afectan a la complejidad de la enfermedad (defectos intraóseos y lesiones de furca). Una vez finalizada, la respuesta al tratamiento es reevaluada nuevamente.
4. *Fase de mantenimiento periodontal*, dirigida a conservar la estabilidad periodontal obtenida mediante la combinación de las fases anteriores. Esta fase del tratamiento debe ser realizada en intervalos regulares en función del riesgo de progresión individual de cada paciente.

1.1.3 Periodontitis y bacteriemia

La bacteriemia se define como la presencia transitoria o continua de bacterias viables en sangre (Carmona et al., 2002), y ocurre tras la manipulación de los tejidos periodontales, ya sea durante el tratamiento periodontal o durante actividades cotidianas como la masticación o la higiene oral (Schenkein et al., 2020a). En pacientes con periodontitis, la ulceración del epitelio de la bolsa periodontal, facilita el contacto entre el *biofilm* subgingival y el tejido conectivo, permitiendo la invasión y diseminación sistémica de diversas especies periodontopatógenas (Bourgeois et al., 2019; Schenkein et al., 2020a). Tomás y colaboradores, concluyeron en un meta-análisis que el estado periodontal del paciente y la acumulación de *biofilm* dental presentan una asociación positiva significativa con la prevalencia de bacteriemia tras el cepillado dental (Tomás et

al., 2012).

1.1.3.1. Prevalencia

La prevalencia de bacteriemia tras diferentes procedimientos en la cavidad oral es muy variable entre estudios y depende en gran medida del método de identificación microbiológica empleado, el momento en el que se toma la muestra, el estado periodontal del paciente y el procedimiento realizado (Schenkein et al., 2020a). La tabla 1 resume la prevalencia de bacteriemia obtenida en diversos estudios tras la realización de diferentes intervenciones.

Prevalencia de bacteriemia tras distintas intervenciones

<i>Intervención</i>	<i>Prevalencia</i>	<i>Autores</i>
Cepillado dental	5% – 13%	(Forner et al., 2006; Kinane et al., 2005)
Cepillado interproximal	6,6%	(Ambrosio et al., 2019)
Hilo interdental	30% - 40%	(Cresta et al., 2009; Zhang et al., 2013)
Sondaje periodontal	16% – 54,8%	(Castillo et al., 2011a; Daly et al., 1997, 2001; Kinane et al., 2005)
Raspado y alisado radicular	13% - 80,9%	(Beutler et al., 2019; Forner et al., 2006; Kinane et al., 2005; Lafaurie et al., 2007; Waghmare et al., 2013; Zhang et al., 2013)

Tabla 1. Estudios sobre prevalencia de bacteriemia tras distintos procedimientos.

En 2014, Horliana y colaboradores, realizan una revisión sistemática recopilando estudios observacionales que estudiaban la presencia de bacterias en muestras de sangre tomadas antes, durante y después de procedimientos periodontales en pacientes con periodontitis. A pesar de la heterogeneidad metodológica de los estudios incluidos, 106 de 219 (49,4%) pacientes, presentaron bacterias en sangre tras la intervención (Horliana et al., 2014).

1.1.3.2. Técnicas microbiológicas en bacteriemias

En muestras de sangre, se emplean diversas técnicas microbiológicas para la detección de bacterias orales: cultivo anaerobio directo (CAD), técnicas de hemocultivo mediante sistemas automáticos (como BACTEC®), hemocultivo por lisis-centrifugación o técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR). Las tres primeras son técnicas de cultivo estándar que presentan limitaciones como la

necesidad de obtener bacterias viables, cultivo en condiciones favorables para las bacterias de estudio, necesidad de realizar observaciones morfológicas y test bioquímicos para la identificación y mayor tiempo de procesamiento. Las técnicas moleculares permiten superar estas limitaciones y presentan una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con las técnicas de cultivo, sin embargo, suponen un mayor coste económico y requieren una curva de aprendizaje mayor (Marín et al., 2016).

- *Cultivo anaerobio directo*: Consiste en el cultivo de las muestras en atmósfera anaeróbica y en medios de cultivo selectivos y no selectivos. Es considerado el método de referencia o gold standard para determinar la utilidad de nuevas técnicas microbiológicas (Sanz et al., 2004).
- *Hemocultivo mediante sistemas automáticos (BACTEC®)*: Se basan en la detección de la producción de CO₂ por los microorganismos de la muestra a través de sistemas informatizados, de manera que indican la presencia/ausencia (técnica cualitativa) de microorganismos en la muestra (Loza et al., 2003).
- *Hemocultivo por lisis-centrifugación*: consiste en la inoculación de la muestra de sangre en tubos que contienen saponina y agentes anticoagulantes, resultando en la lisis de las células sanguíneas. Posteriormente se separan los microorganismos de los elementos sanguíneos mediante centrifugado y se cultiva en distintos medios (Loza et al., 2003).
- *qPCR*: las técnicas de PCR permiten la obtención de grandes cantidades de ADN mediante ciclos de amplificación y el empleo de ADN polimerasa (Taq polimerasa), secuencias de oligonucleótidos (*primer*) y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP). La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) permite cuantificar los fragmentos de ADN mediante el uso de controles específicos (medición en fase exponencial del ciclo de amplificación) (Sanz et al., 2004).

Con el fin de determinar una herramienta diagnóstica válida para la detección de bacteriemias de origen periodontal, Marín y colaboradores, realizan en 2017, un estudio *in vitro* comparando las técnicas mencionadas. Los resultados del estudio mostraron que CAD y qPCR presentaban los mejores resultados en la identificación y cuantificación de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Streptococcus oralis* en estudios de bacteriemia; y el hemocultivo, los peores resultados (Marín et al., 2017).

1.2. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos, y que incluyen: hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y miocardiopatías (WHO, 2017).

Entre los factores de riesgo asociados a las enfermedades cardiovasculares, destacan la hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión, hiperglicemia, obesidad o resistencia a la insulina. La prevención primaria consiste en la detección precoz y modificación de los factores de riesgo asociados a hábitos de vida, con el objetivo de ralentizar la progresión de la enfermedad (Hinton et al., 2018; Laslett et al., 2012).

En cuanto a su prevalencia, las enfermedades cardiovasculares suponen al menos la mitad de las enfermedades no transmisibles, encontrándose como la primera causa de muerte a nivel mundial y acumulando 17,9 millones de muertes anuales (Roth et al., 2017).

1.2.1. Etiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares

La arteriosclerosis, uno de los principales eventos en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, involucra las respuestas de la inmunidad innata y adaptativa, que generan una respuesta inflamatoria en la lesión ateromatosa (Libby et al., 2009). La inflamación tendrá un papel fundamental desde el inicio de la enfermedad hasta su desenlace en complicaciones trombóticas.

Los factores de riesgo mencionados pueden dar lugar a una lesión endotelial crónica que conlleva disfunción endotelial (aumento de la permeabilidad y adhesión leucocitaria) y la migración y adhesión de monocitos sanguíneos (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Estos procesos promueven la expresión de moléculas de adhesión (como moléculas de adhesión vasculares, VCAM-1) por las células endoteliales que, en estado de salud, resisten la adhesión leucocitaria. La expresión de estas moléculas se produce por una acumulación de partículas de lipoproteínas en la capa íntima, activación del factor nuclear κ B, y por mediadores proinflamatorios, como IL-1 β y TNF- α , secretados por células musculares lisas y células endoteliales adyacentes a la lesión vascular (Libby, 2006; Rafieian-Kopaei et al., 2014).

La formación de la placa de ateroma se produce por adhesión de monocitos y linfocitos T que penetran el revestimiento endotelial hacia la capa íntima. Una vez ahí, los monocitos maduran y se transforman en macrófagos y comienzan a captar moléculas de LDL oxidado (oxLDL) a través de receptores “*scavenger*”, dando lugar a la formación de células espumosas (Libby, 2006; Zmysłowski and Szterk, 2017). Estas células, tras su apoptosis, forman el núcleo o centro lipídico de la placa de ateroma madura, que será encapsulada por una capa fibrosa formada por células musculares lisas (Geovanini and Libby, 2018)(Figuras 2 y 3).

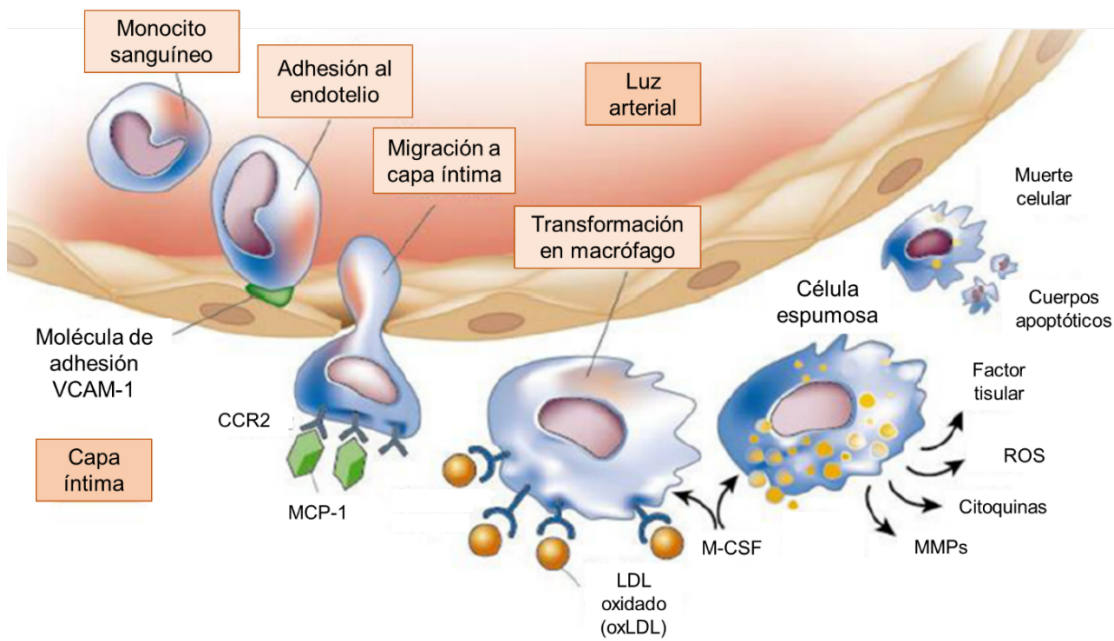


Figura 2. Papel de los monocitos en la aterogénesis. Adaptado de Libby y colaboradores, 2002.

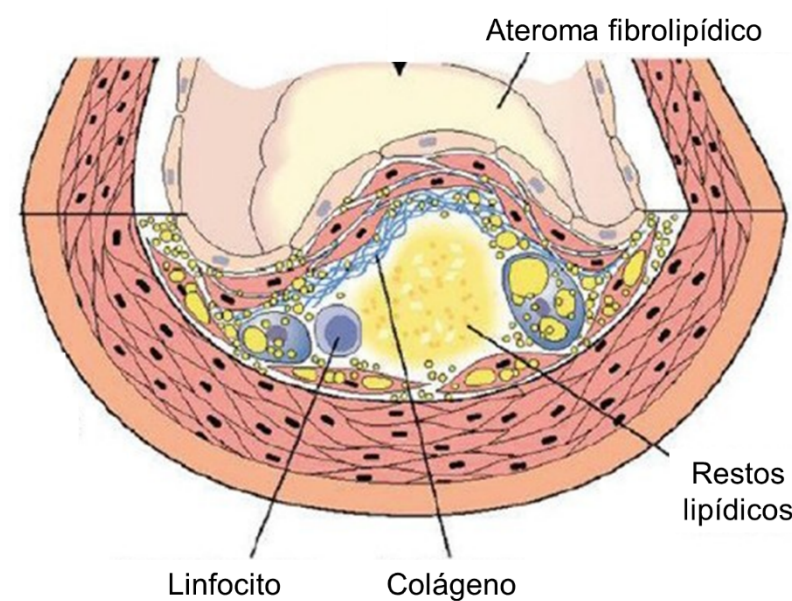


Figura 3. Esquema general de la placa de ateroma madura, caracterizado por proliferación de células musculares lisas, deposición de colágeno, matriz y lípidos extracelulares. Adaptado de Rafieian-Kopaei y colaboradores, 2014.

Las células espumosas secretan citoquinas locales y especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas se encuentran las MMPs, que facilitan la ruptura de la placa por degradación de la matriz extracelular. Finalmente, la ruptura de la placa conlleva la liberación de potentes factores de coagulación, dando lugar a complicaciones trombóticas (Geovanini and Libby, 2018).

1.2.2. Tratamiento de las enfermedades cardiovasculares

El tratamiento de las enfermedades cardiovasculares se divide en: control de los factores de riesgo, terapia farmacológica y alternativas quirúrgicas; empleadas de manera individual o combinada.

El *control de los factores de riesgo* ya mencionados tiene como objetivo reducir el estímulo inflamatorio, medido a través de la presencia de mediadores inflamatorios en sangre, como proteína C reactiva (CRP) o TNF- α .

La *terapia farmacológica* se divide en (Orlandi et al., 2020; Riccioni and Sblendorio, 2012):

- *Terapia antiplaquetaria* (ej.: aspirina): reduciendo la formación de trombos y la inflamación vascular.
- *Terapia anticoagulante* (ej.: warfarina): inhibición de diferentes rutas en la cascada de coagulación mediante el empleo de antagonistas de la vitamina K, inhibidores de la trombina o inhibidores del factor Xa.
- *Terapia antihipertensiva* (ej.: betabloqueantes): inhibición de la angiotensina II, que actúa como citoquina proinflamatoria y aumenta los niveles de ROS.
- *Terapias de regresión de la placa de ateroma o reductoras de los niveles de lípidos*: destacan las estatinas, inhibidores de fosfodiesterasas y tiazolidenionas, fármacos dirigidos a la disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre y con actividad antiinflamatoria (Geovanini and Libby, 2018; Kalanuria et al., 2012).

También se han propuesto *alternativas quirúrgicas* en estados avanzados de la enfermedad, aunque no eliminan el factor causal de la enfermedad (Libby, 2006):

- *Bypass* coronario: implica la revascularización mediante la conexión de otras

arterias al sector coronario más allá de la obstrucción.

- *Angioplastia o stents* coronarios: expansión de la arteria mediante el uso de catéteres y colocación de un *stent* para mantener la circulación.
- *Endarterectomía*: eliminación quirúrgica de los depósitos fibrolipídicos en la arteria.

1.3. Asociación entre periodontitis y enfermedades cardiovasculares

La prevalencia de las enfermedades cardiovasculares no puede ser explicada por completo por los factores de riesgo convencionales, por lo tanto, las infecciones, tanto agudas como crónicas, han sido propuestas como potencial causa de arterioesclerosis (Herrera et al., 2020). Entre estas infecciones, la periodontitis, por su prevalencia, podría ser la más común.

La *medicina periodontal* es una disciplina que estudia el impacto de la inflamación o infección periodontal sobre la salud extraoral (Offenbacher, 1996), indicando una relación bidireccional en la cual la periodontitis puede influir sobre la salud sistémica de un individuo y diferentes enfermedades sistémicas afectar a la salud periodontal (Williams and Offenbacher, 2000).

1.3.1. Plausibilidad biológica

Las enfermedades cardiovasculares comparten factores de riesgo con las enfermedades periodontales y se caracterizan por un importante componente inflamatorio (Sanz et al., 2020a). En base a ello, se han propuesto diferentes vías por las que se establece una relación entre ambas enfermedades (Friedewald et al., 2009; Li et al., 2000).

- **Bacteriemia**. La periodontitis es una enfermedad con base infecciosa de origen bacteriano en la que participan múltiples organismos con capacidad de invasión celular, como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. Estos patógenos y sus productos pueden participar en el proceso de disfunción endotelial de manera directa, estableciendo así una conexión entre las enfermedades periodontales y las enfermedades cardiovasculares (Tonetti et al., 2007). Un ejemplo claro de capacidad de invasión y diseminación sistémica lo encontramos en *P. gingivalis*. Aunque no se ha demostrado hasta el momento una relación de causalidad directa con el desarrollo de placas de ateroma, múltiples estudios reportan la capacidad

de estas bacterias para modular el entorno e invadir células epiteliales gingivales y células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo* (Velsko et al., 2014a). También en estudios con ratas ApoE, se ha demostrado que la monoinfección con *P. gingivalis* resulta en mayor formación de placas de ateroma (Hayashi et al., 2011).

- Toxinas bacterianas. Los productos bacterianos, como endotoxinas (lipopolisacáridos) o exotoxinas (enzimas citolíticas), también pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo, alcanzando zonas distantes y produciendo toxicidad (Li et al., 2000). *Porphyromonas gingivalis*, mediante interacción de distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) con receptores tipo *Toll-2* (TLR-2), estimula la producción de citoquinas y quimioquinas, induciendo la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), VCAM-1 y selectina p, con un papel clave en la inducción de disfunción endotelial (Viafara-García et al., 2019).
- Inflamación sistémica. La periodontitis produce una respuesta defensiva por el organismo, mediante la producción de mediadores proinflamatorios que inducen la respuesta inmune. Estos mediadores, como IL-1, IL-6, TNF- α o proteína C reactiva (CRP), que se producen de forma local como respuesta ante la presencia de *biofilm* subgingival, pueden alcanzar la circulación sistémica y desencadenar una respuesta inmune en otros tejidos (Aarabi et al., 2018; Schenkein et al., 2020a).
- Autoinmunidad. Diversas enfermedades asociadas a procesos autoinmunes se han asociado con arterioesclerosis y enfermedad cardiovascular acelerada. Entre los autoanticuerpos involucrados en esta asociación destacan las proteínas de choque térmico (HSP), los autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas y lípidos modificados (Aarabi et al., 2018; Schenkein et al., 2020a). La evidencia actual sugiere que este tipo de anticuerpos podrían ser inducidos por patógenos periodontales (Schenkein et al., 2020a).

Durante el *Perio & Cardio Workshop* realizado en 2019 de manera conjunta entre *European Federation of Periodontology* (EFP) y *World Health Federation* (WHF) (Sanz et al., 2020a), se propusieron siete evidencias que relacionan el papel las enfermedades periodontales en la etiología de las enfermedades cardiovasculares a través de su componente microbiológico (Herrera et al., 2020):

1. Diseminación de bacterias periodontales a tejidos vasculares sistémicos.
2. Presencia de material genético de origen bacteriano en placas de ateroma.
3. Presencia de bacterias periodontales vivas en placas de ateroma.
4. Evidencia in vitro de invasión de células endoteliales.
5. Evidencia de la inducción de arteriosclerosis en modelos animales por bacterias periodontales.
6. Evidencia in vitro e in vivo de que serotipos con mutaciones no invasivas producen menor patología en modelos animales.
7. Bacterias periodontales inoculadas de placas de ateroma humanas pueden producir arteriosclerosis en el modelo animal.

Múltiples estudios han demostrado que las bacterias periodontales podrían estar involucradas en el proceso de formación de las placas de ateroma tras detectar la presencia de ADN bacteriano procedente de microorganismos orales en éstas.

Figuro y colaboradores, en 2011, empleando técnicas de PCR anidada, detectan ADN de origen bacteriano procedente de bacterias periodontales como *P. gingivalis* (78,5%), *A. actinomycetemcomitans* (67%) y *T. forsythia* (61,9%) en 42 muestras de placas de ateroma de pacientes sometidos a endarterectomías (Figuro et al., 2011).

Velsko y colaboradores en 2014, en un estudio experimental en ratas ApoE observan que la infección crónica por *P. gingivalis*, produce una respuesta inmune específica (IgG), con un aumento significativo en la reabsorción ósea oral e inflamación aórtica. Además se observó una invasión activa de este patógeno en el epitelio oral, la aorta y la placa de ateroma (Velsko et al., 2014b).

En la revisión sistemática y metaanálisis de Joshi y colaboradores, se analiza la frecuencia de detección de diversos microorganismos periodontales en las placas de ateroma de pacientes que han sufrido infarto agudo de miocardio. Entre las bacterias detectadas, las más frecuentes fueron *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Joshi et al., 2019).

1.3.2. Evidencia epidemiológica

La asociación entre las enfermedades periodontales y las enfermedades cardiovasculares ha sido investigada con anterioridad en estudios transversales, de casos

y controles y estudios de cohortes y, posteriormente sintetizada en revisiones sistemáticas y metaanálisis.

En el metaanálisis realizado por Paraskevas y colaboradores en 2008, se observó una diferencia media de 1,56 mg/l en los niveles de CRP entre los pacientes con periodontitis y pacientes periodontalmente sanos (Paraskevas et al., 2008).

En 2007, Mustapha y colaboradores concluyen que, en pacientes con enfermedades periodontales con gran exposición bacteriana a nivel sistémico, existe una fuerte asociación con enfermedad coronaria, presentando un odds ratio (OR) 1,75 (CI 95% [1,32 - 2,34], $p < 0,001$) (Mustapha et al., 2007).

Otro análisis similar observó que los pacientes periodontales presentan una probabilidad 1,14 veces mayor de desarrollar enfermedad coronaria (riesgo relativo [RR] 1,14 CI 95% [1,07 - 1,21], $p < 0,001$), esta probabilidad aumentaba entre los casos y controles (OR 2,22 CI 95% [1,59 - 3,11], $p < 0,001$) (Bahekar et al., 2007).

Fagundes y colaboradores realizan en 2019 tres metaanálisis valorando la asociación entre periodontitis y accidente cerebrovascular isquémico (5 estudios, OR 2,72 [2,00 - 3,71], $p < 0,00001$); y entre periodontitis e infarto agudo de miocardio (7 estudios de casos y controles, OR 2,31 [1,39 - 3,84], $p = 0,001$) (3 estudios de cohortes, RR 1,81 [1,55 - 2,28], $p < 0,00001$) (Fagundes et al., 2019).

Podemos inferir de los resultados obtenidos en estos estudios que existe una asociación estadísticamente significativa entre la prevalencia e incidencia de enfermedades cardiovasculares y las enfermedades periodontales.

1.3.3. Estudios de intervención

Tonetti y colaboradores realizaron un ensayo clínico comparando tratamiento periodontal no quirúrgico supra- y subgingival en los niveles de vasodilatación endotelial de la arteria braquial en pacientes con periodontitis crónica severa y sistémicamente sanos. Se observó una asociación positiva entre la mejora de la salud periodontal y los parámetros cardiovasculares (Tonetti et al., 2007).

En 2015, Hada y colaboradores realizan un ensayo clínico comparando los efectos de la terapia periodontal no quirúrgica en pacientes con enfermedad coronaria. En los

resultados tras 6 meses, se observó una reducción significativa en la presión sistólica, LDL y en los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) en el grupo experimental, demostrando los efectos positivos de la terapia periodontal en estos pacientes (Hada et al., 2015).

Sin embargo, otros estudios, no obtienen resultados positivos. En 2008, se presentó el estudio PAVE (*Periodontitis and Vascular Events*), un estudio piloto comparando el tratamiento periodontal no quirúrgico supra- y subgingival en los niveles de hsCRP en pacientes con periodontitis y enfermedad cardiovascular establecida. Los resultados no fueron claros, dado que la alta prevalencia de obesidad en la muestra de estudio anuló los efectos del tratamiento periodontal sobre la variable de estudio (Offenbacher et al., 2009). En 2018, Saffi y colaboradores, evaluaron la eficacia del tratamiento periodontal en la función endotelial de pacientes con enfermedad coronaria. Tras 3 meses de seguimiento, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en las variables cardiovasculares estudiadas (Saffi et al., 2018).

1.4. Justificación

La justificación para la realización de este estudio es la existencia de pocos ensayos clínicos que valoren el impacto en la función cardiovascular (medido como el cambio en la VDE) del tratamiento periodontal básico en pacientes con periodontitis y enfermedad cardiovascular establecida, con un seguimiento extenso de 6 meses.

El subanálisis que se presentará en el este Trabajo de Fin de Máster se realiza en base a la existencia de pocos estudios que correlacionen los efectos del tratamiento periodontal básico sobre la incidencia de bacteriemia en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Dado que existe un mayor riesgo en pacientes con periodontitis de sufrir bacteriemias debido al daño en los tejidos periodontales producido por la enfermedad, y dado el papel clave que demuestran *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* tanto en el desarrollo de periodontitis como de las placas de ateroma, relacionando la salud oral con la salud sistémica, parece relevante la realización de un ensayo clínico para evaluar los posibles efectos sobre la frecuencia de bacteriemia tras el tratamiento periodontal básico.

2. Hipótesis

2.1. Hipótesis general del estudio

El tratamiento periodontal básico es capaz de mejorar la función cardiovascular evaluada a través de variables subrogadas (VDE y EIMC), en pacientes con periodontitis estadio III o IV y con enfermedad cardiovascular establecida.

2.2. Hipótesis específica de este subanálisis

En pacientes con periodontitis estadios III o IV y con enfermedad cardiovascular establecida existe un riesgo aumentado de sufrir bacteriemia, especialmente tras el tratamiento periodontal básico, consistente en raspado y alisado radicular, en comparación con la profilaxis supragingival.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general del estudio

Evaluar si el tratamiento periodontal básico a nivel subgingival modifica la función cardiovascular en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida y periodontitis.

3.2. Objetivos específicos del análisis de la submuestra

- Comparar los efectos del tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular o profilaxis supragingival) sobre la frecuencia de bacteriemia mediante técnicas de CAD y qPCR.
- Determinar la naturaleza de las bacteriemias tras el tratamiento periodontal básico mediante CAD y qPCR en ambos grupos.
- Determinar si existe correlación entre los recuentos de bacterias a nivel subgingival y los recuentos bacterianos detectados a nivel vascular.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

Este estudio presentará los resultados preliminares de la submuestra de pacientes que participaron durante el periodo comprendido entre septiembre de 2019 y julio de 2020 de un ensayo clínico aleatorizado y controlado, paralelo y a triple ciego.

4.2. Selección de la muestra

El reclutamiento se realizó en el Servicio de Cardiología del Hospital Severo Ochoa de Leganés, sobre aquellos pacientes que acudieron de forma secuencial a la unidad de Rehabilitación Cardíaca por padecer enfermedad cardiovascular establecida. Entre estos pacientes, tras una exploración periodontal completa a cargo de un periodoncista experimentado de la Facultad de Odontología de la UCM, se seleccionaron aquellos pacientes con periodontitis y de acuerdo con los siguientes criterios:

4.2.1. Criterios de inclusión

- Pacientes con enfermedad cardiovascular establecida: antecedentes de síndrome coronario agudo (ángor inestable o infarto) en los 3 a 12 meses previos, con fracción de eyección ventricular izquierda $\geq 50\%$.
- Diagnóstico de periodontitis estadio III o IV generalizada: en base al estudio publicado por Tonetti y colaboradores en 2007, en el que se empleó la definición de periodontitis avanzada establecida en el *Workshop Internacional para la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales* de 1999 (Armitage, 1999), se incluyeron pacientes con profundidades de sondaje superiores a 5mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en al menos el 50% de los dientes, que según la clasificación actual correspondería al diagnóstico de periodontitis mencionado (Tonetti et al., 2007).
- Presencia de al menos 3 dientes por cuadrante.

4.2.2. Criterios de exclusión

- Pacientes que hubieran recibido tratamiento periodontal en el último año.
- Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.

- Fumadores de ≥ 10 cigarrillos/día.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Diabetes mellitus tipo I, o tipo II con valores de hemoglobina glicosilada $> 7\%$.
- Infección por virus de inmunodeficiencia humana.
- Toma crónica de antiinflamatorios no esteroideos.

4.3. Cálculo del tamaño muestral

Tomando como referencia los resultados obtenidos por Tonetti y colaboradores 2007, se estableció una diferencia esperada de 1% en la vasodilatación endotelial (VDE) entre ambos grupos, con una desviación estándar de 1,76%, potencia estadística del 90% y error alfa del 5%. Esto supondría un tamaño muestral a priori de 48 pacientes por grupo y 96 en total. Para compensar posibles pérdidas y ajustar factores de confusión, se seleccionarán un total de 120 pacientes (aumento de 20%).

4.4. Aleatorización y ocultación de la asignación

Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos y se asignaron los tratamientos a cada sujeto de estudio mediante una aleatorización por bloques (tamaño del bloque = 4), realizada por un monitor del estudio.

La ocultación de la asignación se realizó mediante el empleo de sobres opacos, sellados y numerados. La revelación de la asignación se realizó en el momento inmediato al comienzo de la primera sesión de tratamiento periodontal.

4.5. Enmascaramiento

Se llevó a cabo un triple enmascaramiento de:

- *Evaluador*: las variables periodontales y microbiológicas fueron registradas por personas diferentes al operador, que no conocían el tratamiento recibido por cada paciente.
- *Paciente*: los pacientes desconocían el grupo de estudio al que pertenecían.
- *Analista*: los datos fueron aportados ocultando el tratamiento recibido por cada grupo.

4.6. Intervención

Las intervenciones fueron realizadas en las clínicas del Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCM por un único operador experimentado. La duración del tratamiento se realizó de acuerdo con las necesidades de cada paciente.

4.6.1. Grupo test

El tratamiento experimental consistió en tratamiento periodontal básico compuesto por dos sesiones de raspado y alisado radicular (RAR) con anestesia local en dos días consecutivos (intervalo de 24 horas). Tras la primera sesión, se prescribió el uso de colutorio de clorhexidina 0,12% (PerioAid 0,12% tratamiento, Dentaïd, España) durante 2 semanas (Posología: 15ml, 60 segundos, cada 12 horas).

4.6.2. Grupo control

El grupo control recibió un tratamiento periodontal compuesto por tartrectomía y profilaxis supragingival, con anestesia local, en dos días consecutivos (intervalo de 24 horas). Tras la primera sesión, se prescribió el uso de colutorio de fluoruro sódico 0,05% y xilitol 1,00% (Fluor-Aid 0,05%, Dentaïd, España) durante 2 semanas (Posología: 15ml, 60 segundos, cada 12 horas).

4.6.3. Seguimiento

Ambos grupos recibieron un seguimiento total de 6 meses, con reevaluaciones intermedias a los 1 y 3 meses. Se realizó terapia periodontal de mantenimiento cada 3 meses.

4.6.4. Protocolo de seguridad

Se estableció que aquellos pacientes en los que durante alguna de las visitas de seguimiento se detectase progresión de la periodontitis, definida como pérdida longitudinal de inserción clínica >2 mm en 2 o más dientes (Tonetti and Claffey, 2005), serían retirados del estudio y recibirían el tratamiento periodontal que precisaran.

4.7. Extracción de datos

En la tabla 2 se indica la cronología para la recogida de datos, toma de muestras y realización de las sesiones de tratamiento periodontal, así como el lugar en el que se llevó a cabo cada uno de éstos. En este subanálisis se presentarán los datos recogidos durante la cita basal, y las dos citas de tratamiento.



						
	Historia médica	Evaluación Periodontal	Intervención: Raspado y alisado radicular/ Profilaxis	Muestras subgingivales	Muestras de sangre (bacteriemia)	Terapia periodontal de mantenimiento
Basal						
1ª visita de tratamiento						
2ª visita de tratamiento: 24h						
Re-evaluación: 1 mes						
Re-evaluación: 3 meses						
Re-evaluación: 6 meses						

Tabla 2. Cronografía de la extracción de datos. Se marca en color verde la cita correspondiente a cada uno de los procesos de recolección de datos realizadas a lo largo del estudio y en color amarillo las citas en las que se realizó la intervención asignada.

4.7.1. Historia médica

La historia médica de cada paciente se obtuvo durante la visita basal, recopilando información sobre sexo, edad, tabaquismo, colesterol total, presión arterial sistólica en reposo, obesidad, circunferencia abdominal, sedentarismo, postmenopausia, historia familiar de ECV prematura, triglicéridos, resistencia a la insulina. En este subanálisis sólo se presentará la información relativa al sexo, edad y tabaquismo, el resto de las variables no pudieron ser analizadas en este trabajo debido a limitaciones en el acceso a los registros médicos tras la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2.

4.7.2. Datos periodontales

El examen periodontal fue realizado mediante el empleo de una sonda periodontal milimetrada UNC-15 (Hu-Friedy, Europa, Rotterdam, Holanda) y fue realizado por un único examinador entrenado y calibrado. Se hicieron registros de boca completa,

exceptuando los cordales, valorando 6 localizaciones en cada diente. Las variables clínicas registradas fueron:

- Profundidad de sondaje (PS). Distancia, en mm, desde el margen gingival hasta el fondo de la bolsa periodontal.
- Recesión gingival (REC). Distancia, en mm, desde el margen gingival hasta el límite amelocementario (LAC).
- Índice de placa (IP). Presencia o ausencia de placa dental, en porcentaje, tras desplazar la sonda sobre el tercio cervical de la corona dentaria.
- Sangrado al sondaje (SS). Presencia o ausencia de sangrado, en porcentaje, 30 segundos después del sondaje.
- Índice de supuración al sondaje (SupS). Presencia o ausencia de supuración, en porcentaje, 30 segundos después del sondaje.

4.7.4. Muestras microbiológicas subgingivales

Tras la primera evaluación periodontal, se seleccionó la localización más accesible, con mayor PS y SS de cada cuadrante, introduciendo sucesivamente dos puntas de papel estériles, durante 10 segundos, en cada localización hasta alcanzar el fondo de la bolsa periodontal (Mombelli et al., 1991).

Las 8 puntas de papel obtenidas fueron introducidas en único vial conteniendo 2ml de fluido de transporte reducido (RTF) y enviadas inmediatamente al laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid para su posterior análisis.

Las muestras microbiológicas de fluido crevicular gingival fueron repetidas durante la visita de seguimiento a los 6 meses siguiendo el mismo procedimiento.

Las muestras fueron analizadas tanto por CAD como por qPCR. Los recuentos bacterianos serán expresados como en unidades formadores de colonias por mililitro (UFC/ml).

4.7.5. Muestras microbiológicas de sangre (bacteriemia)

Se analizó y cuantificó la presencia de bacterias periodontales en sangre antes y durante el tratamiento periodontal en ambos grupos. Los procedimientos de extracción

fueron realizados en el quirófano de implantes de la Clínica de Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, por un enfermero experimentado.

El procedimiento para la extracción de sangre fue el siguiente: se tomó una vía en la vena antecubital, permitiendo la toma repetida de muestras mediante técnica convencional (Vacutainer™, BecktonDickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En cada extracción, se tomó un volumen total de 4ml, de los cuales 2ml se emplearon para cultivo microbiológico y 2ml para análisis por qPCR.

Los momentos para la toma de las muestras fueron antes de comenzar la intervención y a los 3 y 10 minutos tras el inicio del procedimiento. Esta toma siguió el mismo protocolo establecido para todos los pacientes: tanto en el grupo test como en el grupo control se comenzó la intervención (raspado y alisado radicular o profilaxis) por el cuadrante de mayor afectación, se seleccionaron las 10 localizaciones más afectadas y se instrumentaron durante 1 minuto, tras los cuales se continuó con el procedimiento en el resto de los cuadrantes. Transcurridos 3 y 10 minutos del inicio del tratamiento, la instrumentación fue detenida y se tomaron nuevas muestras de sangre. Posteriormente, se continuó el procedimiento asignado de forma rutinaria.

Las muestras de sangre fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense.

Las muestras fueron analizadas tanto por CAD como por qPCR. Los recuentos bacterianos serán expresados en UFC/ml.

4.8. Análisis microbiológico

Las muestras de sangre y subgingivales fueron procesadas inmediatamente tras la toma en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

4.8.1. Análisis mediante cultivo microbiológico

4.8.1.1. Muestras subgingivales

El vial con las puntas de papel fue vorteadado durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en solución tampón fosfato salino (PBS). De cada dilución se plaquearon:

- 100 µl en medio agar no selectivo (Oxoid nº2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l). Estas placas se emplearon para determinar el recuento total de bacterias anaerobias e identificar bacterias específicas como *P. gingivalis*.
- 100 µl en medio Dentaaid-1 (Alsina et al., 2001), para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*.

Las placas de agar sangre fueron examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ a 37°C). Las placas Dentaaid-1 se examinaron tras 3-5 días de incubación en aire con 5% CO₂ a 37°C.

Los recuentos totales de anaerobios se realizaron sobre las placas de agar no selectivo, así como la identificación y cuantificación de bacterias periodontales como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* y *Eikenella corrodens*. Para la identificación, se emplearon la tinción Gram y la morfología celular, aerotolerancia y actividad catalasa, y se confirmaron mediante test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE. UU.). Para el recuento total se consideró la placa con la dilución más adecuada (entre 30-300 colonias) y se calculó el porcentaje que suponía cada especie respecto a la flora total.

Los recuentos de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron sobre las placas Dentaaid-1. Para la identificación, se emplearon la morfología de la colonia, la actividad catalasa positiva y el empleo de enzimas específicas (RapID™ NH System, Remel, Leneza, KS, EE. UU.).

4.8.1.2. Muestras de sangre (bacteriemia)

De cada muestra de sangre (2mL), fueron plaqueados directamente:

- 500 µl en placas agar sangre no selectivas.
- 500 µl en placas Dentaaid-1.
- El mililitro restante fue repartido en 5 palcas de agar sangre y en 5 palcas de

Dentaid-1 con un volumen de 100 µl en cada placa.

Las placas de agar sangre fueron examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ a 37°C). Las placas Dentaid-1 se examinaron tras 3-5 días de incubación en aire con 5% CO₂ a 37°C.

4.8.2. Análisis mediante qPCR

4.8.2.1. Extracción de ADN bacteriano

La extracción del ADN bacteriano se realizó de manera inmediata tras la toma de las muestras subgingivales y de sangre mediante el kit comercial MolYsis™ Complete5 (MolzymbGmbH & Co.KG., Bremen, Alemania).

- Muestras subgingivales: las puntas de papel fueron vorteadas durante 2 minutos y el sobrenadante recogido y transferido a un vial estéril de 1,5 ml. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 2 minutos.
- Muestras de sangre: el proceso de extracción se realizó a partir de 1ml de la sangre recogida en cada momento.

Las muestras de ADN fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis.

4.8.2.2. Amplificación mediante qPCR

Para la amplificación de ADN de *P. gingivalis*, se emplearon (Boutaga et al., 2003):

- Primer 1 (forward), con secuencia 5-GCG CTC AAC GTT CAG CC-3 (300nM).
- Primer 2 (reverse), con secuencia 5-CAC GAA TTC CGC CTGC-3 (300nM).
- Sonda Taqman, con secuencia 5-CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA-3 (300nM).

Para la amplificación de ADN de *A. actinomycetemcomitans*, se emplearon (Boutaga et al., 2005):

- Primer 1 (forward), con secuencia 5-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3 (300nM).
- Primer 2 (reverse), con secuencia 5-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3

(300nM).

- Sonda Taqman, con secuencia 5-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-3 (100nM).

Las sondas Taqman en ambos casos fueron marcadas con los fluorocromos 6-carboxyfluoresceína (FAM) en el extremo 5' y con 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'.

La cuantificación se realizó mediante curvas estándar obtenidas a través de diluciones seriadas desde 10^1 a 10^9 de ADN genómico purificado de *P. gingivalis* ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* DSM 8324.

Las muestras se analizaron por duplicado en un volumen final de 20 μ l, en una solución master mix conteniendo las concentraciones óptimas mencionadas de cada uno de los primers y sondas y 5 μ l de ADN de las muestras. Se realizaron controles negativos conteniendo 5 μ l de agua estéril para determinar los límites de detección, considerando el ciclo de cuantificación obtenido para estos controles como ausencia de ADN.

Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de amplificación de 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos se analizaron mediante el termociclador LightCycler® 480 (Roche).

4.9. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados de acuerdo con el protocolo preestablecido. Se determinó como unidad de análisis el paciente. La variable respuesta primaria de este subanálisis es la prevalencia de bacteriemia en sangre, y las variables secundarias: recuentos totales de bacterias anaerobias, recuentos de bacterias específicas, proporción y prevalencia de las bacterias estudiadas a nivel subgingival; recuentos de bacterias específicas a nivel de sangre; las variables clínicas periodontales (IP, REC, PS, SS y SupS) y las variables demográficas (edad, sexo, tabaquismo).

Para el análisis de la distribución de la muestra se observaron la tendencia central, la dispersión y la asimetría de la misma mediante la representación gráfica de los datos. Así mismo se realizó el test de Shapiro Wilk para observar si los datos se distribuían según la norma.

Los datos fueron expresados mediante valores de media y desviación estándar (DE) y mediana y rango intercuartil (RI), prevalencia y proporciones (%). Las variables cuantitativas fueron comparadas mediante test T de Student para muestras independientes, para aquellas variables en las que se obtuvo una distribución normal de la muestra. El análisis de las variables sin distribución normal se realizó mediante test no paramétricos, empleando el test U-Mann Whitney para comparaciones intergrupo. Las variables cualitativas se compararon intergrupo mediante test de chi cuadrado. Las comparaciones intragrupo se realizaron comparando los datos extraídos pretratamiento y a los 3 y 10 minutos de comenzar la intervención.

También se realizaron test de correlación de Spearman para determinar la existencia de asociación lineal entre los recuentos de bacterias subgingivales y los recuentos de bacterias en sangre para cada uno de los tiempos de estudio.

Todas las comparaciones fueron realizadas estableciendo un nivel de significación de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (ver. 26.0, IBM Corporation, NY, EE. UU.).

5. Resultados

5.1. Descripción de la submuestra

Este subanálisis incluye los resultados de 25 pacientes, 14 pertenecientes al grupo control (profilaxis supragingival) y 11 al grupo test (raspado y alisado radicular).

Las características basales de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 3. De los 25 pacientes que componen la submuestra, 24 eran hombres (n = 11 / 100% test; n = 13 / 92,90% control). La media de edad fue de 57,38 años en el grupo test y 57,90 años en el grupo control. En cuanto al hábito tabáquico, el número medio de cigarrillos consumidos al día en el grupo test fue de 1,00 (DE=2,13) cigarrillos/día, en contraste con 0,40 (DE=0,96) en el grupo control cigarrillos/día.

Tras analizar diferencias entre ambos grupos para las características basales descritas, se determinó que no existían diferencias entre grupos para las variables: edad, sexo o número de cigarrillos al día.

Variable	Control (n = 14)		Test (n = 11)		Valor p
	Media (DE)	Mediana (RI)	Media (DE)	Mediana (RI)	
Edad	57,90 (14,16)	53,50 (47,00)	57,38 (9,04)	57,00 (24,00)	0,90 ^a
Nº cigarrillos/día	0,40 (0,96)	0,00 (3,00)	1,00 (2,13)	0,00 (6,00)	0,73 ^b
Sexo	n (%)				
Hombre	13 (92,90)		11 (100)		1,00 ^c
Mujer	1 (7,10)		0 (0)		

Tabla 3. Características demográficas basales para los participantes del grupo test y control.

DE (desviación estándar), RI (rango intercuartil), ^a test T de Student, ^b test U-Mann Whitney, ^c test de Chi Cuadrado

5.2. Variables clínicas periodontales

Las características basales para cada uno de los parámetros clínicos periodontales estudiados se muestran en la tabla 4. No se observaron diferencias en los parámetros clínicos periodontales en el análisis intergrupo ($p > 0,05$).

Variable	Control		Test		Valor p
	Media (DE)	Mediana (RI)	Media (DE)	Mediana (RI)	
IP (%)	81,43 (15,62)	87,01 (44,05)	73,99 (26,14)	83,08 (69,39)	0,393 ^a
REC total (mm)	1,10 (0,91)	0,80 (3,21)	0,76 (0,57)	0,67 (1,89)	0,913 ^b
REC interproximal (mm)	0,97 (0,92)	0,62 (3,20)	0,69 (0,56)	0,65 (1,83)	0,784 ^b
REC caras libres (mm)	1,36 (0,94)	1,23 (3,23)	0,88 (0,60)	0,73 (2,02)	0,827 ^b
PS total (mm)	4,24 (0,56)	4,11 (1,92)	3,74 (0,38)	3,55 (1,10)	0,092 ^a
PS interproximal (mm)	4,52 (0,53)	4,45 (1,80)	4,03 (0,34)	3,91 (0,98)	0,065 ^a
PS caras libres (mm)	3,67 (0,67)	3,46 (2,18)	3,17 (0,49)	3,07 (1,44)	0,242 ^a
SS (%)	59,77 (25,15)	64,35 (76,28)	53,86 (9,90)	54,07 (31,35)	0,305 ^a
SupS (%)	1,30 (2,28)	0,00 (6,35)	0,25 (0,35)	0,00 (0,72)	0,387 ^b

Tabla 4. Características clínicas periodontales basales para los participantes del grupo test y control.

DE (desviación estándar), RI (rango intercuartil), IP (índice de placa), REC (recesión), PS (profundidad de bolsa al sondaje), SS (sangrado al sondaje), SupS (supuración al sondaje), ^a test T de Student, ^b test U-Mann Whitney

También se compararon las características clínicas de las localizaciones en las que se tomaron las muestras microbiológicas subgingivales. En la tabla 5 se muestran los resultados, observándose la ausencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las localizaciones seleccionadas para el análisis subgingival entre los grupos test y control.

Variable	Control		Test		Valor p
	Media (DE)	Mediana (RI)	Media (DE)	Mediana (RI)	
IP (%)	90,00 (17,48)	100,00 (50,00)	90,63 (18,60)	100,00 (50,00)	0,924 ^b
REC (mm)	1,38 (1,66)	0,63 (5,50)	0,91 (0,69)	0,63 (2,00)	0,742 ^a
PS (mm)	6,18 (1,00)	6,00 (3,50)	5,97 (0,96)	5,88 (3,00)	0,900 ^a
SS (%)	87,50 (13,18)	87,50 (25,00)	84,38 (18,60)	87,50 (50,00)	0,630 ^b
SupS (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-

Tabla 5. Características clínicas periodontales basales de las localizaciones para muestras subgingivales.

DE (desviación estándar), RI (rango intercuartil), IP (índice de placa), REC (recesión), PS (profundidad de bolsa al sondaje), SS (sangrado al sondaje), SupS (supuración al sondaje), ^a test T de Student, ^b test U-Mann Whitney

5.3. Variables microbiológicas periodontales

5.3.1 Análisis por cultivo anaerobio directo (CAD)

En la comparación de la prevalencia, los recuentos y las proporciones, totales y para cada una de las especies periodontales estudiadas, no se observan diferencias significativas en el estado basal entre el grupo test y control ($p > 0,05$). Las especies *A. actinomycetemcomitans* y *Eikenella corrodens* no pudieron ser identificadas mediante la técnica de cultivo en el grupo control y tampoco se detectaron bacterias de la especie *Capnocytophaga* en el grupo test. La tabla 6 muestra los recuentos y prevalencia en la detección de las bacterias de estudio mediante técnica de cultivo.

	Total	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Tf</i>	<i>Pm</i>	<i>Fn</i>	<i>Cr</i>	<i>Ec</i>	<i>Capno</i>
Prevalencia [n (%)]										
Control	-	1 (7,70)	13 (100,00)	13 (100,00)	10 (76,90)	2 (15,40)	3 (23,10)	10 (76,90)	1 (7,70)	1 (7,70)
Test	-	1 (9,10)	10 (90,90)	11 (100,00)	9 (81,80)	2 (18,20)	5 (45,50)	8 (72,70)	1 (9,10)	0 (0,00)
Valor p §	-	1,000	0,458	1,000	1,000	1,000	0,390	1,000	1,000	1,000
Recuento (UFC/ml) [media (DE)]										
Control	2,87 x 10 ⁷ (2,28 x 10 ⁷)	0 (0)	8,03 x 10 ⁶ (7,35 x 10 ⁶)	1,51 x 10 ⁶ (3,66 x 10 ⁶)	1,31 x 10 ⁶ (1,52 x 10 ⁶)	1,90 x 10 ⁵ (4,07 x 10 ⁵)	1,00 x 10 ⁴ (3,16 x 10 ⁴)	2,52 x 10 ⁵ (3,80 x 10 ⁵)	0 (0)	1,00 x 10 ⁴ (3,16 x 10 ⁴)
Test	2,89 x 10 ⁷ (2,53 x 10 ⁷)	2,28 x 10 ³ (6,43 x 10 ³)	1,24 x 10 ⁷ (1,79 x 10 ⁷)	7,52 x 10 ⁵ (9,16 x 10 ⁵)	8,51 x 10 ⁵ (1,57 x 10 ⁶)	1,75 x 10 ⁵ (3,41 x 10 ⁵)	2,50 x 10 ⁴ (4,63 x 10 ⁴)	4,83 x 10 ⁵ (4,31 x 10 ⁵)	1,25 x 10 ⁴ (3,54 x 10 ⁴)	0 (0)
Valor p	0,941 †	0,856	0,516 †	0,602 †	0,907	0,929	0,531	0,413	0,856	0,358
Proporción (%) [media (DE)]										
Control	-	0 (0)	30,23 (23,21)	3,78 (5,54)	3,18 (3,39)	0,67 (1,62)	0,01 (0,05)	0,84 (0,89)	0 (0)	0,05 (0,16)
Test	-	0,01 (0,02)	26,86 (25,33)	3,41 (3,27)	3,25 (4,80)	0,81 (1,75)	0,07 (0,13)	4,13 (6,70)	0,04 (0,11)	0 (0)
Valor p	-	0,856	0,754 †	0,839	0,930	0,929	0,317	0,640	0,952	0,358

Tabla 6. Prevalencia, recuentos y proporción de cada uno de los microorganismos analizados mediante CAD.

DE (desviación estándar), UFC (Unidades formadoras de colonias), *Aa* (*A. actinomycetemcomitans*), *Pg* (*P. gingivalis*), *Pi* (*P. intermedia*), *Tf* (*Tannerella forsythia*), *Pm* (*Parvimonas micra*), *Fn* (*Fusobacterium nucleatum*), *Cr* (*Campylobacter rectus*), *Ec* (*Eikenella corrodens*), *Capno* (*Capnocytophaga spp.*), § test de Chi Cuadrado, † test T de Student, test de U-Mann Whitney si no se indica lo contrario)

Las especies más prevalentes fueron *P. gingivalis* y *P. intermedia*, encontrándose ambas en el 100% de los sujetos del grupo control y en el 90,90% y 100% de los sujetos del grupo test respectivamente.

5.3.2. Análisis por qPCR

Como se observa en la tabla 7, el análisis por qPCR para la cuantificación de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en las muestras subgingivales tampoco mostró diferencias intergrupo estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Recuento (UFC/ml)	Control		Test		Valor p
	Media (DE)	Mediana (RI)	Media (DE)	Mediana (RI)	
<i>Aa</i>	4,34 x 10 ⁵ (1,09 x 10 ⁶)	8,48 x 10 ² (3,44 x 10 ⁶)	1,18 x 10 ⁵ (2,73 x 10 ⁵)	0,00 (7,84 x 10 ⁵)	0,807 ^a
<i>Pg</i>	1,78 x 10 ⁶ (2,73 x 10 ⁶)	6,27 x 10 ⁵ (8,85 x 10 ⁶)	3,26 x 10 ⁶ (6,66 x 10 ⁶)	1,62 x 10 ⁵ (1,94 x 10 ⁷)	0,829 ^a

Tabla 7. Recuentos basales de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mediante qPCR.

DE (desviación estándar), IR (rango intercuartil), UFC (Unidades formadoras de colonias), *Aa* (*A. actinomycetemcomitans*), *Pg* (*P. gingivalis*), ^a test U-Mann Whitney

5.4. Bacteriemia

El CAD no logró detectar presencia de *P. gingivalis* ni *A. actinomycetemcomitans* en ninguna de las muestras, ya sea mediante cultivo en agar sangre o en medio Dentaid-1.

El análisis mediante qPCR detectó bacteriemia, inducida por *P. gingivalis*, en 3 pacientes (prevalencia: 27,30%; recuento: 2,94 x 10¹ UFC/ml) en las muestras basales y en las muestras tomadas tras 10 minutos de tratamiento (prevalencia: 27,30%; recuento: 4,61 x 10¹ UFC/ml). En uno de estos pacientes, también se detectó la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, tanto en la muestra basal, como a los 3 y 10 minutos de tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla 8.

		CAD			qPCR		
		Control	Test	Valor p	Control	Test	Valor p
Prevalencia (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<i>Aa</i>	Basal	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	1 (9,10)	0,440 ^a
	3 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	1 (9,10)	0,440 ^a
	10 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	1 (9,10)	0,440 ^a
<i>Pg</i>	Basal	0 (0)	0 (0)	-	1 (7,10)	3 (27,30)	0,288 ^a
	3 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	1 (9,10)	0,440 ^a
	10 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	3 (27,30)	0,072 ^a
Recuento (UFC/ml)		Media (DE)	Media (DE)		Media (DE)	Media (DE)	
<i>Aa</i>	Basal	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	4,97 x 10 ³ (0)	0,259 ^b
	3 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	2,29 x 10 ³ (0)	0,259 ^b
	10 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	3,72 x 10 ³ (0)	0,259 ^b
<i>Pg</i>	Basal	0 (0)	0 (0)	-	4,73 x 10 ¹ (1,50 x 10 ¹)	2,94 x 10 ¹ (5,45 x 10 ¹)	0,230 ^b
	3 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	2,45 x 10 ¹ (6,92 x 10 ¹)	0,259 ^b
	10 min	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	4,61 x 10 ¹ (8,87 x 10 ¹)	0,042 ^b

Tabla 8. Prevalencia de bacteriemia en los distintos momentos del tratamiento analizado mediante CAD y qPCR.

DE (desviación estándar), *Aa* (*A. actinomycetemcomitans*), *Pg* (*P. gingivalis*), ^a Chi Cuadrado, ^b test U-Mann Whitney.

No se observaron diferencias intergrupo significativas ($p < 0,05$) en la frecuencia de detección de bacteriemia en las muestras basales, a 3 minutos o a 10 minutos del inicio de la intervención.

5.5 Correlación entre recuentos subgingivales y recuentos en sangre

Tras estudiar la relación entre los recuentos orales de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* con los recuentos en sangre de estas mismas bacterias, obtenidos mediante técnica de qPCR, se observa que no existen asociaciones lineales estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los recuentos de ambas bacterias a nivel subgingival y su correspondiente recuento a nivel sanguíneo.

	r	Valor p ^a
<i>Pg</i> oral - <i>Pg</i> sangre (3min)	0,196	0,358
<i>Pg</i> oral - <i>Pg</i> sangre (10min)	0,018	0,933
<i>Aa</i> oral - <i>Aa</i> sangre (3min)	0,156	0,467
<i>Aa</i> oral - <i>Aa</i> sangre (10min)	0,156	0,467

Tabla 9. Correlación entre la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* subgingival y en sangre.

r (índice de correlación), *Aa* (*A. actinomycetemcomitans*), *Pg* (*P. gingivalis*), ^a Correlación de Spearman

6. Discusión

6.1. Resumen de la evidencia

Este estudio tiene como objetivo general evaluar las modificaciones que se producen en la función cardiovascular tras el tratamiento periodontal básico, y de él se extrae el subanálisis presentado en este Trabajo de Fin de Máster, que persigue evaluar la frecuencia de bacteriemia tras el tratamiento periodontal básico en pacientes con periodontitis y enfermedad cardiovascular establecida, esperándose un aumento en su prevalencia tras el inicio de la intervención en comparación con el grupo control (profilaxis supragingival).

El principal hallazgo de este estudio es que no existen diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de bacteriemia a los 3 y 10 minutos del inicio del raspado y alisado radicular en comparación con la profilaxis supragingival, sugiriendo que no aumenta el riesgo de bacteriemia durante ambas intervenciones.

Tras el análisis de las características basales demográficas, clínicas y microbiológicas de los dos grupos estudiados, se observa que no existen diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas, por lo que podemos asumir que ambos grupos son similares y que ninguna de estas variables afectó de manera desigual a la frecuencia, magnitud o naturaleza de las bacteriemias en los grupos de estudio.

Múltiples estudios han analizado la frecuencia de bacteriemia tras diversos procedimientos orales. Analizando en detalle aquellos que estudian la prevalencia tras raspado y alisado radicular, los resultados de prevalencia obtenidos en este trabajo, 27,30%, concuerdan con estudios previos: 23% (Kinane et al., 2005), 40% (Beutler et al., 2019), 43,3% (Zhang et al., 2013); aunque se alejan de la prevalencia obtenida en otros: 70% (Waghmare et al., 2013), 80,9% (Lafaurie et al., 2007). Sin embargo, al comparar resultados debemos tener en cuenta que en este estudio se determina la prevalencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* específicamente, mientras que en los estudios mencionados se da un valor de prevalencia de bacteriemia para todos los microorganismos periodontales detectados.

En la técnica de qPCR se emplearon primers específicos para la identificación y cuantificación de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* al tratarse de las especies

periodontopatógenas más frecuentes presentes en los episodios de bacteriemia y en las placas de ateroma de los pacientes cardiovasculares. Castillo y colaboradores, determinaron una prevalencia mediante PCR anidada de 30,0%% para *P. gingivalis* y de 21,4% para *A. actinomycetemcomitans*, siendo las dos bacterias periodontales más prevalentes en las muestras sanguíneas tomadas (Castillo et al., 2011b). Figuero y colaboradores, determinaron una prevalencia en placas de ateroma de 78,6% para *P. gingivalis* y de 66,7% para *A. actinomycetemcomitans*, resultando también las más frecuentes en este estudio (Figuero et al., 2011).

A pesar de ello, al comparar la prevalencia basal y a los 3 y 10 minutos, se observa que no existe un aumento en la prevalencia de bacteriemia con respecto a los niveles basales tras ninguna de las intervenciones realizadas. En la medición basal, se observó bacteriemia en 3 pacientes del grupo test, los mismos en los que se detectó tras 10 minutos de raspado y alisado radicular; en el grupo control se detectó presencia de *P. gingivalis* en sangre de un paciente en el análisis basal, pero no en los de seguimiento. Esto refuta la hipótesis del estudio, sugiriendo que ni el raspado y alisado radicular ni la profilaxis supragingival aumentan la frecuencia de bacteriemia. Estos resultados contrastan con aquellos obtenidos en estudios previos. Kinane y colaboradores concluyen mediante un ensayo clínico que tanto el sondaje periodontal, el cepillado dental y el raspado y alisado radicular producen un aumento en la bacteriemia medida mediante PCR (23%) y cultivo (13%) (Kinane et al., 2005). Lafaurie y colaboradores, observan que el raspado y alisado radicular induce bacteriemia especialmente en pacientes periodontales (Lafaurie et al., 2007). Esta discrepancia en los resultados obtenidos podría deberse al reducido tamaño muestral, diferencias en la capacidad de detección de los métodos de diagnóstico empleados o interacciones debidas a la frecuente plurimedicación en los pacientes cardiovasculares.

La presencia basal de bacteriemia observada en este estudio, sin embargo, apoya la teoría de que existe, al menos en pacientes periodontales, una invasión de bacterias periodontales al torrente sanguíneo, independientemente de la realización de procedimientos orales sobre el paciente (Raber-Durlacher et al., 2013). Esta bacteriemia basal de baja intensidad puede deberse a actividades cotidianas como el cepillado dental, el uso de seda dental o la masticación, generando una bacteriemia crónica de bajo nivel (Ambrosio et al., 2019; Schenkein et al., 2020b).

Al igual que en estudios previos, los resultados varían en función de la técnica microbiológica empleada. En este estudio, se emplearon la técnica de CAD y qPCR basándonos en los resultados obtenidos en el estudio de Marín y colaboradores (Marín et al., 2017). Los resultados muestran un número mayor de muestras positivas con qPCR, mientras que CAD no logró detectar la presencia de bacterias anaerobias en ninguna de las muestras. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las técnicas de PCR no discriminan entre la detección de bacterias vivas o muertas, y éstas últimas no contribuyen a la definición de bacteriemia. A pesar de ello, la técnica de PCR presenta una mayor sensibilidad y menor umbral de detección ($>1 \times 10^1$ UFC/ml), convirtiéndola en una técnica efectiva para el diagnóstico de bacteriemia. La variabilidad en los resultados obtenidos con ambas técnicas recalca la importancia en la elección de la técnica microbiológica empleada.

Los tiempos de estudio también fueron diferentes con respecto a otros estudios, dificultando las comparaciones, y pudiendo explicar las variaciones en los resultados. La toma de muestras para bacteriemia varía en la mayoría de estudios entre 30 segundos tras el inicio de la intervención hasta 3 minutos después de finalizarlo (Tomás et al., 2012). Sin embargo, actualmente no existen un consenso sobre el momento ideal para la toma de muestras de sangre para el estudio de bacteriemia.

La relevancia de que este estudio se realice en pacientes con periodontitis estadios III y IV reside en el aumento en la probabilidad de diseminación de bacterias en pacientes con enfermedades periodontales en comparación con aquellos que presentan un periodonto sano (Hirschfeld and Kawai, 2015). En estos pacientes, cualquier manipulación mecánica de los tejidos gingivales puede resultar en la inoculación de bacterias al sistema vascular, aumentando la magnitud y frecuencia de bacteriemia (Balejo et al., 2017).

6.2. Fortalezas del estudio

La principal fortaleza del estudio se centra en haber seleccionado pacientes que presentan comorbilidad periodontal y cardiovascular. Por lo tanto, dado que existe un mayor riesgo en pacientes con periodontitis de sufrir bacteriemias y dado el papel clave que demuestran *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* tanto en el desarrollo de periodontitis como de las placas de ateroma, este estudio, una vez finalizado, permitirá

obtener información relevante con respecto a la prevención secundaria de las enfermedades cardiovasculares.

Por otro lado, se debe considerar que el estudio ha sido realizado con alto rigor metodológico, con un protocolo estricto y estandarizado, tanto clínico como en el análisis microbiológico, que permite aumentar la validez interna y reproducibilidad de este estudio, limitando los sesgos y evitando errores metodológicos.

6.3. Limitaciones

Una limitación importante de este estudio se halla en el reducido tamaño de muestra analizado, resultando en una menor capacidad para detectar bacteriemias y obtener resultados precisos. El tamaño de muestra analizado se debe a que este análisis corresponde al de una submuestra de un ensayo clínico, no finalizado, en el que se ha establecido mediante el cálculo del tamaño muestral, una muestra total de 120 pacientes.

Otra limitación del trabajo reside en la imposibilidad de determinar semejanzas basales en cuanto a las variables clínicas cardiovasculares de los pacientes que se incluyen y que podrían afectar a los resultados obtenidos. Debido a las limitaciones en el acceso a centros hospitalarios tras la emergencia mundial provocada por el SARS-CoV-2 que precedió al análisis de este estudio, no se pudieron recuperar las historias médicas y datos clínicos custodiados en dichos centros para su inclusión en este trabajo.

La inclusión de pacientes fumadores en el estudio podría aumentar el riesgo de sesgo, ya que se han demostrado diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición del biofilm oral en pacientes fumadores (Karasneh et al., 2017). Sin embargo, la exclusión de estos pacientes limitaría la extrapolación de los resultados a pacientes cardiovasculares, ya que el tabaquismo es uno de sus principales factores de riesgo. A pesar de ello, la distribución aleatoria muestra que no existen diferencias significativas en cuanto al hábito tabáquico en los grupos estudiados, por lo tanto, podemos considerar que su efecto ha sido similar en ambos.

6.4. Líneas futuras de investigación

Tras la realización de este trabajo, resalta la necesidad en estudios futuros, de:

- Evaluar si el aumento del tamaño muestral permite obtener resultados claros sobre la frecuencia de bacteriemia tras el tratamiento periodontal básico.
- Valorar la correlación entre la mejora de los parámetros microbiológicos periodontales y la función endotelial en los pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.
- Establecer unos tiempos estandarizados para la toma de muestras para el estudio de bacteriemias tras diferentes procedimientos.

6.5. Conclusiones

Teniendo en cuenta las limitaciones de este trabajo, se puede concluir que:

- En la submuestra analizada, la frecuencia e intensidad de la bacteriemia producida por *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* no aumenta tras el tratamiento periodontal básico o la profilaxis supragingival.
- Existe, en algunos pacientes, una bacteriemia crónica de baja intensidad, previa al tratamiento, que puede deberse a hábitos de higiene oral, masticación y otras actividades cotidianas.
- La técnica de qPCR mostró una mayor sensibilidad en la detección de bacteriemias respecto a la técnica CAD.

7. Bibliografía

- Aarabi, G., Heydecke, G., Seedorf, U., 2018. Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19071978>
- Alsina, M., Olle, E., Frias, J., 2001. Improved, Low-Cost Selective Culture Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 509–513. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.509-513.2001>
- Ambrosio, N., Marín, M.J., Laguna, E., Herrera, D., Sanz, M., Figuero, E., 2019. Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Arch. Oral Biol.* 98, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.025>
- Armitage, G.C., 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann. Periodontol.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Bahekar, A.A., Singh, S., Saha, S., Molnar, J., Arora, R., 2007. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: A meta-analysis. *Am. Heart J.* 154, 830–837. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.06.037>
- Balejo, R.D.P., Cortelli, J.R., Costa, F.O., Cyrino, R.M., Aquino, D.R., Cogo-Müller, K., Miranda, T.B., Moura, S.P., Cortelli, S.C., 2017. Effects of chlorhexidine preprocedural rinse on bacteremia in periodontal patients: a randomized clinical trial. *J. Appl. Oral Sci.* 25, 586–595. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0112>
- Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C.R., Bailey, J., Abreu, L.G., Alipour, V., Amini, S., Arabloo, J., Arefi, Z., Arora, A., Ayanore, M.A., Bärnighausen, T.W., Bijani, A., Cho, D.Y., Chu, D.T., Crowe, C.S., Demoz, G.T., Demsie, D.G., Dibaji Forooshani, Z.S., Du, M., El Tantawi, M., Fischer, F., Folayan, M.O., Futran, N.D., Geramo, Y.C.D., Haj-Mirzaian, A., Hariyani, N., Hasanzadeh, A., Hassanipour, S., Hay, S.I., Hole, M.K., Hostiuc, S., Ilic, M.D., James, S.L., Kalhor, R., Kemmer, L., Keramati, M., Khader, Y.S., Kisa, S., Kisa, A., Koyanagi, A., Laloo, R., Le Nguyen, Q., London, S.D., Manohar, N.D., Massenburg, B.B., Mathur, M.R., Meles, H.G., Mestrovic, T., Mohammadian-Hafshejani, A., Mohammadpourhodki, R., Mokdad, A.H., Morrison, S.D., Nazari, J., Nguyen, T.H., Nguyen, C.T., Nixon, M.R., Olagunju, T.O., Pakshir, K., Pathak, M., Rabiee, N., Rafiei, A., Ramezanzadeh, K., Rios-Blancas, M.J., Roro, E.M., Sabour, S., Samy, A.M., Sawhney, M., Schwendicke, F., Shaahmadi, F., Shaikh, M.A., Stein, C., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Unnikrishnan, B., Vu, G.T., Vukovic, A., Warouw, T.S.S., Zaidi, Z., Zhang, Z.J., Kassebaum, N.J., 2020. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J. Dent. Res.* 99, 362–373. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>
- Beutler, J., Jentsch, H.F.R., Rodloff, A.C., Stingl, C.-S., 2019. Bacteremia after professional mechanical plaque removal in patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 25, 1185–1194. <https://doi.org/10.1111/odi.13047>
- Bourgeois, D., Inquimbert, C., Ottolenghi, L., Carrouel, F., 2019. Periodontal Pathogens as Risk Factors of Cardiovascular Diseases, Diabetes, Rheumatoid Arthritis,

- Cancer, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease—Is There Cause for Consideration? *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100424>
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C., Savelkoul, P., 2003. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Subgingival Plaque Samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4950–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4950-4954.2003>
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M., 2005. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.03.011>
- Carasol, M., Llodra, J.C., Fernández-Meseguer, A., Bravo, M., García-Margallo, M.T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M., Herrera, D., 2016. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J. Clin. Periodontol.* 43, 548–556. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12558>
- Carmona, I.T., Diz Dios, P., Scully, C., 2002. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 93, 660–670. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.122338>
- Castillo, D.M., Sánchez-Beltrán, M.C., Castellanos, J.E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M., Lafaurie, G.I., 2011a. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J. Clin. Periodontol.* 38, 418–427. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01717.x>
- Castillo, D.M., Sánchez-Beltrán, M.C., Castellanos, J.E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M., Lafaurie, G.I., 2011b. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J. Clin. Periodontol.* 38, 418–427. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01717.x>
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.* 2000 64, 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Crasta, K., Daly, C.G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., Heitz-Mayfield, L.J.A., 2009. Bacteraemia due to dental flossing. *J. Clin. Periodontol.* 36, 323–332. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01372.x>
- Daly, C., Mitchell, D., Grossberg, D., Highfield, J., Stewart, D., 1997. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust. Dent. J.* 42, 77–80. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1997.tb00100.x>
- Daly, C.G., Mitchell, D.H., Highfield, J.E., Grossberg, D.E., Stewart, D., 2001. Bacteremia Due to Periodontal Probing: A Clinical and Microbiological Investigation. *J. Periodontol.* 72, 210–214. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.2.210>
- Fagundes, N.C.F., Almeida, A.P.C.P.S.C., Vilhena, K.F.B., Magno, M.B., Maia, L.C., Lima, R.R., 2019. Periodontitis As A Risk Factor For Stroke: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Vasc. Health Risk Manag.* 15, 519–532. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S204097>
- Figuro, E., Sánchez-Beltrán, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J.M., Castro, J.A. del, Gutiérrez, J.M., Herrera, D., Sanz, M., 2011. Detection of Periodontal Bacteria in Atheromatous Plaque by Nested Polymerase Chain Reaction. *J. Periodontol.* 82, 1469–1477. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100719>
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., Holmstrup, P., 2006. Incidence of bacteremia after

- chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 33, 401–407. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00924.x>
- Friedewald, V.E., Kornman, K.S., Beck, J.D., Genco, R., Goldfine, A., Libby, P., Offenbacher, S., Ridker, P.M., Van Dyke, T.E., Roberts, W.C., 2009. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease††Published simultaneously in the Journal of Periodontology, the Official Journal of the American Academy of Periodontology. *Am. J. Cardiol.* 104, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.05.002>
- Geovanini, G.R., Libby, P., 2018. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin. Sci.* 132, 1243–1252. <https://doi.org/10.1042/CS20180306>
- Graziani, F., Karapetsa, D., Alonso, B., Herrera, D., 2017. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol.* 2000 75, 152–188. <https://doi.org/10.1111/prd.12201>
- Hada, D.S., Garg, S., Ramteke, G.B., Ratre, M.S., 2015. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Clinical and Biochemical Risk Markers of Cardiovascular Disease: A Randomized Trial. *J. Periodontol.* 86, 1201–1211. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150249>
- Hajishengallis, G., Darveau, R.P., Curtis, M.A., 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Hajishengallis, G., Lamont, R.J., 2012. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* 27, 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hayashi, C., Viereck, J., Hua, N., Phinikaridou, A., Madrigal, A.G., Gibson, F.C., Hamilton, J.A., Genco, C.A., 2011. Porphyromonas gingivalis Accelerates Inflammatory Atherosclerosis in the Innominate Artery of ApoE Deficient Mice. *Atherosclerosis* 215, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.009>
- Herrera, D., Molina, A., Buhlin, K., Klinge, B., 2020. Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontol.* 2000 83, 66–89. <https://doi.org/10.1111/prd.12302>
- Hinton, W., McGovern, A., Coyle, R., Han, T.S., Sharma, P., Correa, A., Ferreira, F., de Lusignan, S., 2018. Incidence and prevalence of cardiovascular disease in English primary care: a cross-sectional and follow-up study of the Royal College of General Practitioners (RCGP) Research and Surveillance Centre (RSC). *BMJ Open* 8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020282>
- Hirschfeld, J., Kawai, T., 2015. Oral Inflammation and Bacteremia: Implications for Chronic and Acute Systemic Diseases Involving Major Organs. *Cardiovasc. Haematol. Disord. - Drug Targetsrug Targets - Cardiovasc. Hematol. Disord.* 15, 70–84.
- Horliana, A.C.R.T., Chambrone, L., Foz, A.M., Artese, H.P.C., Rabelo, M. de S., Pannuti, C.M., Romito, G.A., 2014. Dissemination of Periodontal Pathogens in the Bloodstream after Periodontal Procedures: A Systematic Review. *PLOS ONE* 9, e98271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098271>
- Joshi, C., Bapat, R., Anderson, W., Dawson, D., Hijazi, K., Cherukara, G., 2019. Detection of periodontal microorganisms in coronary atheromatous plaque specimens of myocardial infarction patients: A systematic review and meta-analysis. *Trends Cardiovasc. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.12.005>

- Kalanuria, A.A., Nyquist, P., Ling, G., 2012. The prevention and regression of atherosclerotic plaques: emerging treatments. *Vasc. Health Risk Manag.* 8, 549–561. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S27764>
- Karasneh, J.A., Al Habashneh, R.A., Marzouka, N.A.S., Thornhill, M.H., 2017. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. *BMC Oral Health* 17, 64. <https://doi.org/10.1186/s12903-017-0359-4>
- Kinane, D.F., Riggio, M.P., Walker, K.F., MacKenzie, D., Shearer, B., 2005. Bacteraemia following periodontal procedures. *J. Clin. Periodontol.* 32, 708–713. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00741.x>
- Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., Papapanou, P.N., 2017. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Kornman, K.S., 2008. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *J. Periodontol.* 79, 1560–1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>
- Lafaurie, G.I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M.F., Castillo, D.M., Aya, M.R., Barón, A., Hurtado, P.A., 2007. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J. Clin. Periodontol.* 34, 873–879. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01125.x>
- Lamont, R.J., Hajishengallis, G., 2015. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol. Med.* 21, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>
- Laslett, L.J., Alagona, P., Clark, B.A., Drozda, J.P., Saldivar, F., Wilson, S.R., Poe, C., Hart, M., 2012. The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues: A Report From the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol., The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Diagnostic and Treatment Options, Policy Considerations* 60, S1–S49. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.002>
- Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad, L., Olsen, I., 2000. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 547–558.
- Libby, P., 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 456S–460S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.456S>
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., 2009. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 2129–2138. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>
- Loza, E., Planes, R., Rodríguez, M., 2003. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- Marín, M.J., Ambrosio, N., Virto, L., Diz, P., Álvarez, M., Herrera, D., Sanz, M., Figuero, E., 2017. Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study | Elsevier Enhanced Reader. *Arch. Oral Biol.* 74, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.11.007>
- Marín, M.-J., Figuero, E., González, I., O'Connor, A., Diz, P., Álvarez, M., Herrera, D., Sanz, M., 2016. Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 21, e276–e284. <https://doi.org/10.4317/medoral.20842>
- Mombelli, A., McNabb, H., Lang, N.P., 1991. Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J. Periodontal Res.* 26, 308–313. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb02068.x>
- Mustapha, I.Z., Debrey, S., Oladubu, M., Ugarte, R., 2007. Markers of systemic bacterial

- exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Periodontol.* 78, 2289–2302. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.070140>
- Offenbacher, S., 1996. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann. Periodontol.* 1, 821–878. <https://doi.org/10.1902/annals.1996.1.1.821>
- Offenbacher, S., Beck, J.D., Moss, K., Mendoza, L., Paquette, D.W., Barrow, D.A., Couper, D.J., Stewart, D.D., Falkner, K.L., Graham, S.P., Grossi, S., Gunsolley, J.C., Madden, T., Maupome, G., Trevisan, M., Van Dyke, T.E., Genco, R.J., 2009. Results From the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: A Pilot Multicentered, Randomized, Controlled Trial to Study Effects of Periodontal Therapy in a Secondary Prevention Model of Cardiovascular Disease. *J. Periodontol.* 80, 190–201. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080007>
- Orlandi, M., Graziani, F., D’Aiuto, F., 2020. Periodontal therapy and cardiovascular risk. *Periodontol.* 2000 83, 107–124. <https://doi.org/10.1111/prd.12299>
- Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D.H., Flemmig, T.F., Garcia, R., Giannobile, W.V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R.T., Kebschull, M., Kinane, D.F., Kirkwood, K.L., Kocher, T., Kornman, K.S., Kumar, P.S., Loos, B.G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G.J., Teles, R., Tonetti, M.S., 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* 89 Suppl 1, S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Paraskevas, S., Huizinga, J.D., Loos, B.G., 2008. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 35, 277–290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x>
- Raber-Durlacher, J.E., Laheij, A.M.G.A., Epstein, J.B., Epstein, M., Geerligs, G.M., Wolffe, G.N., Blijlevens, N.M.A., Donnelly, J.P., 2013. Periodontal status and bacteremia with oral viridans streptococci and coagulase negative staphylococci in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients: a prospective observational study. *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer* 21, 1621–1627. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1706-2>
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., Nasri, H., 2014. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int. J. Prev. Med.* 5, 927–946.
- Riccioni, G., Sblendorio, V., 2012. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 9, 305–317. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1263.2012.02132>
- Roth, G.A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S.F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K., Alla, F., Alvis-Guzman, N., Amrock, S., Ansari, H., Ärnlöv, J., Asayesh, H., Atey, T.M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., Banerjee, A., Barac, A., Bärnighausen, T., Barregard, L., Bedi, N., Belay Ketema, E., Bennett, D., Berhe, G., Bhutta, Z., Bitew, S., Carapetis, J., Carrero, J.J., Malta, D.C., Castañeda-Orjuela, C.A., Castillo-Rivas, J., Catalá-López, F., Choi, J.-Y., Christensen, H., Cirillo, M., Cooper, L., Criqui, M., Cundiff, D., Damasceno, A., Dandona, L., Dandona, R., Davletov, K., Dharmaratne, S., Dorairaj, P., Dubey, M., Ehrenkranz, R., El Sayed Zaki, M., Faraon, E.J.A., Esteghamati, A., Farid, T., Farvid, M., Feigin, V., Ding, E.L., Fowkes, G., Gebrehiwot, T., Gillum, R., Gold, A., Gona, P., Gupta, R., Habtewold, T.D., Hafezi-Nejad, N., Hailu, T., Hailu, G.B., Hankey, G., Hassen, H.Y., Abate, K.H., Havmoeller, R., Hay, S.I., Horino, M., Hotez, P.J., Jacobsen, K., James, S., Javanbakht, M., Jeemon, P., John, D.,

- Jonas, J., Kalkonde, Y., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Khader, Y., Khan, A., Khang, Y.-H., Khera, S., Khoja, A.T., Khubchandani, J., Kim, D., Kolte, D., Kosen, S., Krohn, K.J., Kumar, G.A., Kwan, G.F., Lal, D.K., Larsson, A., Linn, S., Lopez, A., Lotufo, P.A., El Razek, H.M.A., Malekzadeh, R., Mazidi, M., Meier, T., Meles, K.G., Mensah, G., Meretoja, A., Mezgebe, H., Miller, T., Mirrakhimov, E., Mohammed, S., Moran, A.E., Musa, K.I., Narula, J., Neal, B., Ngalesoni, F., Nguyen, G., Obermeyer, C.M., Owolabi, M., Patton, G., Pedro, J., Qato, D., Qorbani, M., Rahimi, K., Rai, R.K., Rawaf, S., Ribeiro, A., Safiri, S., Salomon, J.A., Santos, I., Santric Milicevic, M., Sartorius, B., Schutte, A., Sepanlou, S., Shaikh, M.A., Shin, M.-J., Shishehbor, M., Shore, H., Silva, D.A.S., Sobngwi, E., Stranges, S., Swaminathan, S., Tabarés-Seisdedos, R., Tadele Atnafu, N., Tesfay, F., Thakur, J.S., Thrift, A., Topor-Madry, R., Truelsen, T., Tyrovolas, S., Ukwaja, K.N., Uthman, O., Vasankari, T., Vlassov, V., Vollset, S.E., Wakayo, T., Watkins, D., Weintraub, R., Werdecker, A., Westerman, R., Wiysonge, C.S., Wolfe, C., Workicho, A., Xu, G., Yano, Y., Yip, P., Yonemoto, N., Younis, M., Yu, C., Vos, T., Naghavi, M., Murray, C., 2017. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>
- Saffi, M.A.L., Rabelo-Silva, E.R., Polanczyk, C.A., Furtado, M.V., Montenegro, M.M., Ribeiro, I.W.J., Kampits, C., Rösing, C.K., Haas, A.N., 2018. Periodontal therapy and endothelial function in coronary artery disease: A randomized controlled trial. *Oral Dis.* 24, 1349–1357. <https://doi.org/10.1111/odi.12909>
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M.A., Cury, J.A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Giacaman, R.A., Herrera, D., Herzberg, M.C., Könönen, E., Marsh, P.D., Meyle, J., Mira, A., Molina, A., Mombelli, A., Quirynen, M., Reynolds, E.C., Shapira, L., Zaura, E., 2017. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 44, S5–S11. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>
- Sanz, M., Castillo, A.M. del, Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J.R., D’Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J.-B., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., Vlachopoulos, C., Wimmer, G., 2020a. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J. Clin. Periodontol.* 47, 268–288. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13189>
- Sanz, M., Herrera, D., Kebschull, M., Chapple, I., Jepsen, S., Beglundh, T., Sculean, A., Tonetti, M.S., Lambert, N.L.F., 2020b. Treatment of Stage I-III Periodontitis – The EFP S3 Level Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Periodontol.* <https://doi.org/10.1111/jcpe.13290>
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M., Silva, A., 2004. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J. Clin. Periodontol.* 31, 1034–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00609.x>
- Sanz, M., Papapanou, P.N., Tonetti, M.S., Greenwell, H., Kornman, K., 2020c. Guest Editorial: Clarifications on the use of the new classification of periodontitis. *J. Periodontol.* Guest Editorial. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0166>
- Schenkein, H.A., Papapanou, P.N., Genco, R., Sanz, M., 2020a. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol.*

- 2000 83, 90–106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>
- Schenkein, H.A., Papapanou, P.N., Genco, R., Sanz, M., 2020b. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol.* 2000 83, 90–106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>
- Socransky, S.S., Smith, C., Haffajee, A.D., 2002. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 29, 260–268. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290313.x>
- Theilade, E., 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 13, 905–911. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb01425.x>
- Tomás, I., Diz, P., Tobías, A., Scully, C., Donos, N., 2012. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* 39, 213–228. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01784.x>
- Tonetti, M.S., Claffey, N., 2005. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J. Clin. Periodontol.* 32, 210–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00822.x>
- Tonetti, M.S., Nibali, L., Parkar, M., Phil, M., Suvan, J., Hingorani, A.D., Vallance, P., 2007. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *N. Engl. J. Med.* 10.
- Velsko, I.M., Chukkapalli, S.S., Rivera, M.F., Lee, J.-Y., Chen, H., Zheng, D., Bhattacharyya, I., Gangula, P.R., Lucas, A.R., Kesavalu, L., 2014a. Active Invasion of Oral and Aortic Tissues by *Porphyromonas gingivalis* in Mice Causally Links Periodontitis and Atherosclerosis. *PLOS ONE* 9, e97811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097811>
- Velsko, I.M., Chukkapalli, S.S., Rivera, M.F., Lee, J.-Y., Chen, H., Zheng, D., Bhattacharyya, I., Gangula, P.R., Lucas, A.R., Kesavalu, L., 2014b. Active Invasion of Oral and Aortic Tissues by *Porphyromonas gingivalis* in Mice Causally Links Periodontitis and Atherosclerosis. *PLOS ONE* 9, e97811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097811>
- Viafara-García, S.M., Morantes, S.J., Chacon-Quintero, Y., Castillo, D.M., Lafaurie, G.I., Buitrago, D.M., 2019. Repeated *Porphyromonas gingivalis* W83 exposure leads to release pro-inflammatory cytokines and angiotensin II in coronary artery endothelial cells. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54259-y>
- Waghmare, A.S., Vhanmane, P.B., Savitha, B., Chawla, R.L., Bagde, H.S., 2013. Bacteremia following scaling and root planing: A clinico-microbiological study. *J. Indian Soc. Periodontol.* 17, 725–730. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.124480>
- WHO, 2017. Cardiovascular diseases (CVDs) [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed 5.25.20).
- Williams, R.C., Offenbacher, S., 2000. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol.* 2000 23, 9–12. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2230101.x>
- Zhang, W., Daly, C.G., Mitchell, D., Curtis, B., 2013. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J. Clin. Periodontol.* 40, 41–52. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12029>
- Zmysłowski, A., Szterk, A., 2017. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids Health Dis.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0579-2>