

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Odontología  
Departamento de Estomatología III



**Impacto del tratamiento periodontal básico en los niveles  
de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans* a nivel local y su relación con la  
enfermedad cardiovascular. Estudio piloto a 6 meses.**

**Blanca Vílchez de la Fuente**

**TUTORA  
Elena Figuero Ruiz**

Madrid, Septiembre 2017



## ***AGRADECIMIENTOS***

A mi tutora, la Dra. Elena Figuro, por confiar en mi para colaborar en el desarrollo de este estudio, por brindarme la oportunidad de involucrarme activamente en un proyecto de investigación que ha captado todo mi interés, por su paciencia y dedicación a la hora de resolver mis numerosas dudas en la realización de este trabajo y por supuesto, por todo lo que me ha transmitido en este curso, abriéndome las puertas de la investigación.

A Ana Molina, que me ha formado durante todo el proceso contando conmigo para llevar a cabo partes importantes de la investigación. Agradecerle todos los conocimientos tan útiles y valiosos que me ha enseñado este año y me han servido tanto.

Por supuesto gracias a todo el equipo de investigación en clínica de la UCM, Nagore Ambrosio, Eduardo Montero y Rosa María Simón, por la ayuda, paciencia y experiencia que me han dedicado continuamente.

También quiero agradecer la ayuda que me han dado los alumnos del Máster de Periodoncia de la UCM, especialmente a Nagore Ambrosio, que sin ella, momentos de apuro o estrés habrían sido mucho más difíciles. Agradecer además a mi compañera Raquel Seco por realizar conmigo determinadas fases de la investigación.

Por último agradecer a mi familia, que me ha apoyado y creído en mí en todo momento, demostrándome una vez más que el esfuerzo da sus frutos.



## Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1. Enfermedades periodontales .....	6
2. Enfermedades cardiovasculares.....	10
3. Relación entre enfermedades periodontales y cardiovasculares .....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
Diseño del estudio.....	24
Selección de la muestra .....	24
Cálculo del tamaño muestral .....	25
Aleatorización.....	25
Ocultación de la asignación.....	25
Enmascaramiento .....	25
Intervención .....	26
Recogida de datos .....	26
Datos médicos generales .....	27
Datos clínicos periodontales .....	27
Mediciones cardiovasculares .....	28
Análisis estadístico .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>DISCUSIÓN</b> .....	34
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. ENFERMEDADES PERIODONTALES

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de carácter **infeccioso-inflamatorio** y **crónico**, de origen multifactorial que se caracterizan por la progresiva destrucción de los tejidos de soporte del diente (Tatakis and Kumar, 2005, Taubman et al., 2007). Según la clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales del *International Workshop* de 1999, se encuentran las enfermedades gingivales y las periodontitis (Armitage, 1999). Así como la gingivitis es una reacción inflamatoria reversible, en la periodontitis existe una destrucción irreversible que puede llevar a la pérdida dentaria, si no se trata. En este *Workshop*, se reclasificó las diferentes formas de periodontitis en tres formas principales (crónicas, agresivas y necrotizantes) y en manifestaciones periodontales de enfermedades sistémicas (Armitage, 1999). La periodontitis agresiva se caracteriza por las siguientes características comunes (Lang et al., 1999): antecedentes médicos no contribuyentes, rápida pérdida de inserción y destrucción ósea y agregación familiar de casos. Por otro lado, la periodontitis crónica es generalmente una forma progresiva de la enfermedad periodontal que en cualquier momento puede exacerbar, dando lugar a una pérdida adicional de inserción y hueso.

La periodontitis crónica puede clasificarse por la extensión y la gravedad. La extensión es el número de localizaciones involucradas y se puede describir como localizada o generalizada: será localizada si  $\leq 30\%$  de las localizaciones están afectadas y generalizada si supera este nivel. La gravedad se puede describir para toda la dentición o para dientes y localizaciones individuales. Como guía general, se clasifica en función de la cantidad de pérdida de inserción clínica (PIC) de la siguiente manera: Leve = 1 a 2 mm PIC, Moderada = 3 a 4 mm PIC y Avanzada =  $\geq 5$  mm PIC (Lindhe et al., 1999).

#### 1.1. Prevalencia

Según la última Encuesta de Salud Oral en España en 2010, entre el 85-94% de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías y entre el 16-30% de los españoles mayores de 35 años tiene periodontitis, alcanzando el grado de avanzada en el 5-11% de la población adulta (LLodra Calvo, 2010). Por su parte, Carasol y colaboradores, en 2016, evalúan la población

trabajadora española y concluyen que las condiciones periodontales más avanzadas están relacionadas con la edad, el sexo (hombres mayores de 45 años) y con el hábito tabáquico, presentando el 21,4% de la población trabajadora bolsas periodontales de más de cuatro milímetros dentro de la cual el 50% es mayor de 55 años (Carasol et al., 2016). Cabe señalar que, a nivel mundial, la periodontitis avanzada es la **sexta condición más frecuente**, afectando al 10,8% de la población global (743 millones de personas), siendo mayor su prevalencia en la tercera y cuarta décadas de la vida (Kassebaum et al., 2014).

Las enfermedades periodontales son responsables de gran parte del edentulismo existente. Por ello, pueden ser fuente de diferencias sociales, reducir la calidad de vida, la función masticatoria y alterar la estética, además de tener un importante impacto en la salud general (Baehni and Tonetti, 2010).

## 1.2. Etiopatogenia

El principal factor etiológico de la periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de **biofilm subgingival** en las superficies dentales (placa dental). El origen **multifactorial** se debe a la interacción de estas bacterias específicas con una serie de factores de riesgo genéticos y adquiridos, siendo el sistema inmune de cada individuo clave, en cuanto a la magnitud de la reacción inflamatoria desencadenada por la presencia de bacterias (AAP, 1996). De las más de 700 especies bacterianas que se han detectado en la microbiota subgingival, muy pocas han demostrado tener un papel esencial en la patogénesis de la periodontitis. Usando los criterios definidos por Haffajee y Socransky en 1994 para identificar patógenos periodontales (Haffajee and Socransky, 1994), se ha demostrado que la presencia de ciertas bacterias, como ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*** y ***Porphyromonas gingivalis***, son un factor de riesgo en la progresión de la enfermedad.

Estas bacterias constan de numerosos factores de virulencia, pudiendo actuar en las propias bacterias comensales del huésped cuando se encuentran en bajas proporciones y producir una **disbiosis** de la microbiota normal (Hajishengallis et al., 2011). La disbiosis es el cambio producido en las comunidades bacterianas, asociadas a salud periodontal, que provoca la ruptura de la relación beneficiosa entre las bacterias y el huésped, afectando negativamente a la salud periodontal (Sanz et al., 2017). Por tanto, las comunidades microbianas que están asociadas con la salud periodontal se hallan en simbiosis con el huésped. El mantenimiento de este estado simbiótico dependerá de factores derivados tanto de las bacterias como del huésped. En las

enfermedades periodontales pueden influir las alteraciones en la efectividad de la respuesta inmune (función deteriorada o número reducido de neutrófilos) y también pueden influir las actividades de ciertas especies bacterianas clave o *keystone* (*P. gingivalis*) capaces de manipular la estructura general de la población bacteriana e influir en toda la comunidad ecológica (Sanz et al., 2017).

Además de los factores de virulencia, ambas bacterias son capaces de inducir una respuesta inmune humoral en el paciente. Se han asociado a infecciones extraorales por traslocación y pueden transmitirse entre miembros de una misma familia (Pathirana et al., 2010).

En diferentes estudios se ha demostrado que la prevalencia de *P. gingivalis* en la población española con periodontitis moderada-avanzada es alta (64,5%) (Sanz et al., 2000). Por otro lado, aunque la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* es menor (Sanz et al., 2000) el alto potencial patógeno de la misma, principalmente por la producción de leucotoxina, la hace igual de relevante (Haubek et al., 2008).

Aunque la acumulación de bacterias en forma de biofilm sea el factor iniciador de las enfermedades periodontales, la respuesta inmune que se desencadena en el huésped es realmente la responsable de la destrucción de los tejidos periodontales. Las células del sistema inmune producen grandes cantidades de mediadores inflamatorios incluyendo **citoquinas** (interleuquinas 1, 6, 8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )), **prostaglandinas** (PG-E2) y **metaloproteinasas** (MMP) responsables de la destrucción del tejido blando y duro. A esta interacción entre la infección bacteriana y el sistema inmune se le añade la influencia de factores de riesgo **genéticos** y **adquiridos** confiriendo el carácter multifactorial a esta enfermedad, previamente mencionado (Page and Kornman, 1997) (*Figura 1*).

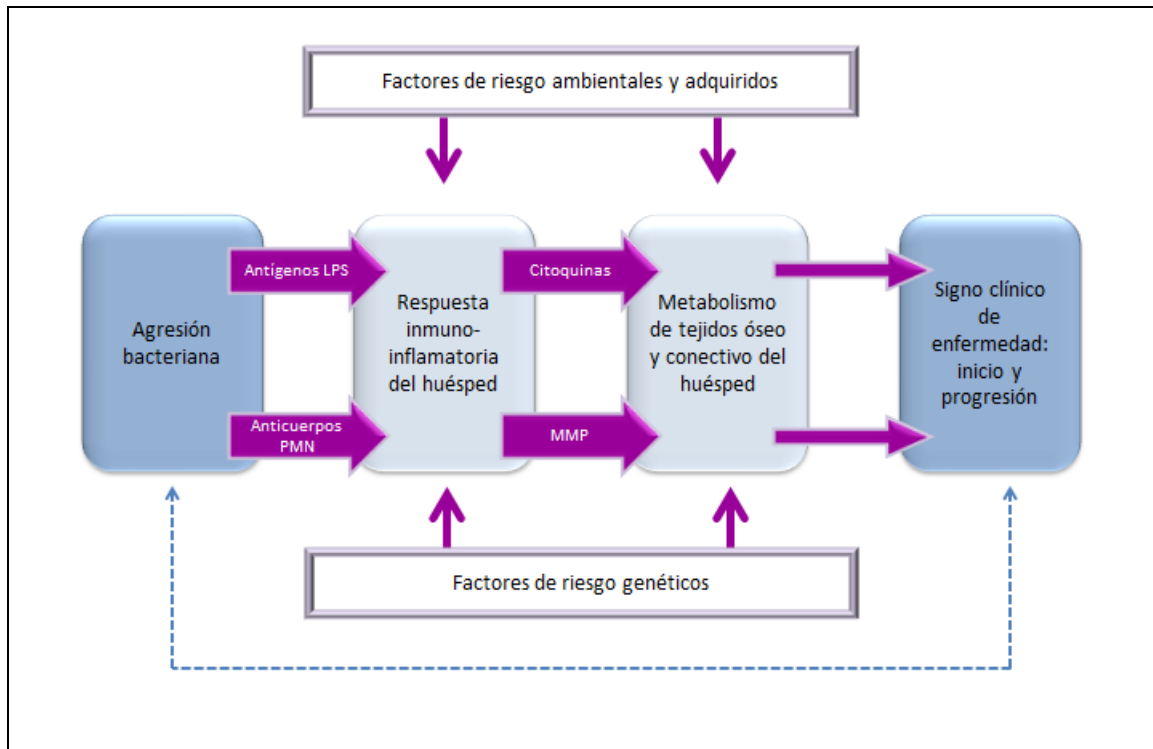


Figura 1: Modelo de patología multifactorial (adaptado de (Kornman, 2008)).

PMN: leucocitos polimorf nucleares, LPS: lipopolisacáridos bacterianos, MMP: metaloproteinasasa

### 1.3. Tratamiento periodontal

El objetivo principal de la terapia periodontal es preservar la dentición natural mediante la detención del proceso inflamatorio crónico. De este modo, el tratamiento periodontal no quirúrgico persigue obtener una superficie libre de cálculo y depósitos microbianos mediante el **raspado y alisado radicular (RAR)**. Ha sido demostrado en diversos estudios que el tratamiento mecánico de la periodontitis mediante **RAR** junto con un **buen control de placa** por parte del paciente es una terapia eficaz en la resolución de la enfermedad periodontal (Sanz and Teughels, 2008), reduciendo las profundidades de sondaje y mejorando los niveles de inserción (Lang et al., 2008).

El RAR se realiza habitualmente con curetas, pero en los últimos años los instrumentos activados mediante tecnología sónica o ultrasónica han mejorado el rendimiento aumentando la capacidad de eliminación de placa y de cálculo (Sanz et al., 2012). Además, estos dispositivos han incorporado sistemas de irrigación para aumentar su eficacia mediante el uso coadyuvante de antimicrobianos (clorhexidina, solución salina o peróxido de hidrógeno) (Sanz et al., 2012).

Tradicionalmente, el tratamiento periodontal básico se ha realizado en sesiones programadas (generalmente a intervalos semanales) de RAR con instrumentos manuales o ultrasónicos (Cobb, 1996). Otros protocolos han sido propuestos como alternativos al método convencional, con el objetivo de evitar la reinfección de las zonas tratadas. Así, en 1995 investigadores de la Universidad de Lovaina proponen el concepto terapéutico de desinfección de boca completa. Este modo de terapia periodontal más intensiva consiste en realizar RAR de todas las bolsas periodontales combinado con enjuagues bucales de **clorhexidina**, en 24 horas (normalmente en 2 sesiones en 2 días consecutivos) (Quirynen et al., 1995). Está demostrado por varias revisiones sistemáticas y ensayos clínicos que el empleo de agentes químicos como coadyuvantes a la terapia periodontal básica es eficaz en el control de placa y gingivitis, siendo la clorhexidina el agente más ampliamente evaluado y eficaz contra los biofilms orales por su alta sustantividad y efecto antimicrobiano (Gunsolley, 2006, Gunsolley, 2010, Van Strydonck et al., 2012, James et al., 2017).

## ***2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES***

Las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas comprenden un grupo de patologías que incluyen la enfermedad coronaria isquémica (angina, infarto agudo de miocardio), la enfermedad cerebrovascular isquémica y la enfermedad arterial periférica. La **aterosclerosis** es una enfermedad progresiva debida a la cual se forman ateromas en las paredes vasculares de arterias grandes elásticas y arterias medianas musculares (Castro Lara, 2001). El infarto agudo de miocardio y el infarto cerebral son el resultado final de la aterosclerosis.

La enfermedad coronaria isquémica se da cuando una de las arterias coronarias se obstruye de forma **parcial** (isquemia miocárdica) o **total** (angina o infarto agudo de miocardio) por la presencia de placas de ateroma en la pared de la arteria (De Teresa et al., 2003). En la **isquemia miocárdica** la obstrucción es parcial, es decir, la placa deja pasar la sangre lo suficiente como para que no haya problemas en reposo, aunque si se realiza un esfuerzo físico hay un desequilibrio entre las demandas de oxígeno del corazón y el aporte de la circulación coronaria. En general, este fenómeno se soluciona cuando cesa la causa. Por el contrario, en la angina o infarto agudo de miocardio la obstrucción que se produce es completa, es decir ocurre una trombosis, donde lo habitual es que no suceda una necrosis del territorio irrigado por la arteria enferma, ya que, durante el proceso de formación del ateroma, ha dado lugar al desarrollo de circulación colateral. Sin embargo, si puede producirse una necrosis cuando una placa

de ateroma joven no obstructiva, se rompe y expone su contenido a la sangre circulante. Este material es altamente trombogénico pudiendo dar lugar a un coágulo que sí produzca una obstrucción completa con la consiguiente interrupción total del flujo coronario y la consecuente necrosis. De manera que si la oclusión es lo suficientemente prolongada se producirá un **infarto agudo de miocardio**, mientras que si la duración es menor puede producirse una **angina inestable** (Fuster, 1994, De Teresa et al., 2003).

La aterosclerosis coronaria es consecuencia tanto de factores genéticos, no modificables, como de otros derivados del ambiente, que son en su mayor parte, modificables. Los factores de riesgo más importantes son la hipertensión arterial, el tabaquismo, los niveles elevados de colesterol en sangre y la diabetes (Wilson et al., 1998).

La enfermedad arterial periférica (EAP) es una patología, que forma parte de la enfermedad vascular periférica (EVP), en la que existe una obstrucción al flujo sanguíneo en las extremidades superiores o inferiores. La causa más frecuente es la enfermedad aterosclerótica, pero también puede deberse a trombosis, embolias, vasculitis, etc (Meurman et al., 2004). La EAP se correlaciona con el riesgo de padecer eventos adversos cardiacos mayores, ya que se asocia a la aterosclerosis coronaria y cerebral. Por otro lado, solo una pequeña parte de los accidentes cerebro vasculares (ACV) se produce por una oclusión trombótica de una arteria cerebral, ya que la mitad de los ACV tienen un origen aterosclerótico carotideo extracraneal.

## 2.1. Epidemiología

La enfermedad coronaria es hoy día la primera causa de muerte entre la enfermedades cardiovasculares, que a su vez son la **primera causa de muerte** en el mundo occidental (Weber and Noels, 2011).

La enfermedad vascular periférica es la principal causa de enfermedad obstructiva arterial de las extremidades, cuyos casos más avanzados requieren la amputación de la extremidad afectada. Por otro lado, los accidentes cerebrovasculares son la segunda manifestación clínica más frecuente de la aterosclerosis tras la enfermedad coronaria (Norgren et al., 2007).

## 2.2. Etiopatogenia

Hoy en día se sabe que estas patologías no son debidas exclusivamente al depósito de lípidos en la pared de las arterias, sino que, además, se ha demostrado una base inflamatoria de vital importancia. Numerosas investigaciones de diferentes disciplinas (biología celular, epidemiología...) revelan que las lesiones ateroscleróticas poseen un componente inflamatorio (Braunwald, 1996). Es decir, las interacciones celulares involucradas en la aterogénesis son similares a las de enfermedades crónicas, **inflamatorias-fibroproliferativas**, pudiendo describirse la respuesta celular y molecular que tiene lugar como distintiva de una enfermedad inflamatoria (Ross, 1999).

El desarrollo progresivo de las placas de ateroma en la pared de las arterias coronarias se inicia con alteraciones en la función del endotelio producidas por la acción de los factores de riesgo cardiovasculares mencionados (Khazaei et al., 2008). De manera que, la exposición a una dieta rica en lípidos y a otros factores (tabaco, hipertensión arterial, diabetes mellitus, obesidad y resistencia a la insulina), provoca que en el endotelio se expresen **moléculas de adhesión** para diferentes tipos de leucocitos (VCAM-1). Es decir, se produce un aumento de la permeabilidad a partículas circulantes, entre ellas colesterol ligado a **lipoproteínas de baja densidad (LDL)**. Una vez dentro de la pared del vaso, sufren un proceso de oxidación y a través de un gradiente quimiotáctico se reclutan **monocitos** que penetran en la pared del endotelio convirtiéndose en **macrófagos**. Los macrófagos comienzan a fagocitar lipoproteínas y se convierten en **células espumosas**. Cuando estas células sufren apoptosis, se libera su contenido lipídico, el cual pasa a formar parte de la **placa de ateroma** joven. A su vez, las células musculares lisas de la capa media proliferan para formar una **capsula** alrededor de la placa de ateroma. Los linfocitos T presentes elaboran citoquinas inflamatorias (interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), que perpetúan la función de las células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas. De manera que se forma una matriz extracelular que incorpora partículas de colesterol, lipoproteínas y células inflamatorias a la pared del vaso (Libby et al., 2002).

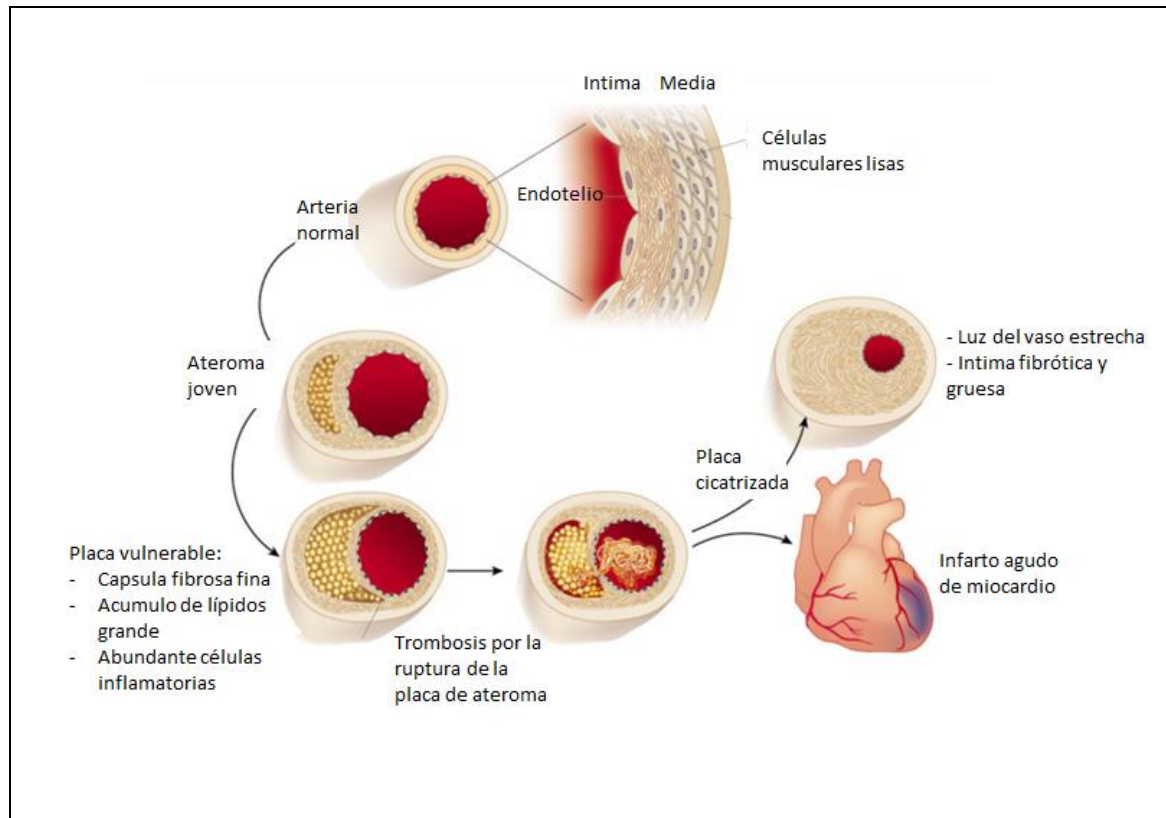


Figura 2: Esquema de la evolución de una placa de ateroma (adaptado de (Libby et al., 2002)).

En fases avanzadas, la placa estrecha la luz del vaso, generalmente el crecimiento es lento, pero una placa blanda poco fibrótica puede sufrir una **ruptura** permitiendo que la sangre circulante se ponga en contacto con el contenido de la placa, dando lugar a un **trombo**. Los fenómenos inflamatorios que se dan en la zona de rotura se traducen en la acumulación de multitud de células inflamatorias y metaloproteinasas que degradan la capsula de la placa (Libby et al., 2002) (Figura 2). El hecho de que una vez producida la rotura de la placa se produzca un trombo más o menos estable depende del estado más o menos **protrombótico** de la sangre circulante.

### 3. RELACIÓN ENTRE ENFERMEDADES PERIODONTALES Y CARDIOVASCULARES

El término “**Medicina Periodontal**” nació de la mano de Steven Offenbacher en 1996. Esta disciplina tiene como objetivo estudiar y establecer una posible relación entre las enfermedades periodontales y las enfermedades o afecciones sistémicas, así como evaluar la plausibilidad biológica e implicaciones preventivas y terapéuticas de las mismas (Offenbacher S, 1996). Por lo que surge un nuevo campo de investigación

periodontal, que explora la evidencia epidemiológica de esta asociación, así como los posibles mecanismos biológicos contribuyentes a esta relación.

La idea de que la cavidad oral no era una estructura aislada del resto del organismo comenzó a cambiar cuando en 1989, un grupo de investigadores finlandeses concluyó que las infecciones de origen odontológico se asociaban positivamente con el desarrollo de infarto agudo de miocardio y con el infarto cerebral (Mattila et al., 1989).

Desde entonces numerosos han sido los estudios realizados analizando la periodontitis y su relación con diferentes enfermedades sistémicas. En el *workshop* conjunto de la Asociación América de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP) en 2013, se exponen las conclusiones con respecto a la evidencia de la asociación, hasta el momento, de la enfermedad periodontal con la diabetes, el embarazo y la enfermedad cardiovascular.

En cuanto a la **diabetes**, se sabe que existe una relación bidireccional entre ambas entidades clínicas. Es decir, se ha demostrado que la diabetes puede aumentar el riesgo de sufrir periodontitis (Salvi et al., 2008) y que la periodontitis crónica puede influir en el curso natural de la diabetes (Lopez et al., 2014). Además, existe evidencia consistente de que la periodontitis, afecta negativamente a los niveles de glucosa en sangre (hemoglobina glicosilada) en personas con y sin diabetes, asociándose por tanto a un mayor riesgo de desarrollar diabetes (Chapple and Genco, 2013).

En el caso del **embarazo**, son muchos los estudios que relacionan la periodontitis con posibles efectos adversos del embarazo como el parto prematuro, la preeclampsia o el bajo peso al nacer (Sanz and Kornman, 2013). Sin embargo, sigue existiendo mucha controversia, la fuerza de las asociaciones observadas basada en parámetros clínicos es modesta y parece variar en función de la población estudiada (Ide et al., 2003).

Con respecto a la **enfermedades cardiovasculares** hay evidencia epidemiológica consistente y fuerte de que la periodontitis ofrece un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular futura (Tonetti and Van Dyke, 2013). Recientemente se han publicado numerosos estudios que aportan evidencia significativa de la asociación positiva entre enfermedades cardiovasculares y enfermedades periodontales (Figuro et al., 2014, Yu et al., 2015, Calapkorur et al., 2016).

### 3.1. Evidencia epidemiológica

En los últimos quince años diferentes estudios epidemiológicos han investigado esta posible asociación entre las enfermedades periodontales y las cardiovasculares (Reyes et al., 2013, Schenkein and Loos, 2013), apoyando la hipótesis de que las periodontitis pueden conferir un riesgo independiente en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. El hecho de que las enfermedades periodontales son una de las enfermedades más frecuentes del ser humano y las enfermedades cardiovasculares la causa de muerte más importante en los países desarrollados, ha motivado un gran interés tanto en la comunidad científica odontológica como en la médica por encontrar una posible relación entre ambas enfermedades.

Un gran número de **estudios observacionales**, fundamentalmente transversales y de casos y controles, han mostrado múltiples asociaciones positivas entre la presencia de periodontitis avanzada y enfermedad coronaria aterosclerótica. Se han publicado varias revisiones sistemáticas, con meta-análisis incluido, que han agrupado la evidencia epidemiológica disponible (Beck and Offenbacher, 2005, Bahekar et al., 2007, Blaizot et al., 2009, Leng et al., 2015, Zeng et al., 2016). Blaizot y colaboradores en 2009 incluyen pacientes con infarto agudo de miocardio además de con otras formas de cardiopatía isquémica y obtiene una odds ratio para el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en pacientes con periodontitis de 2.35 (IC 95%: 1.87-2.96), y un riesgo relativo de 1.34 (IC 95%: 1.27-1.42). Otro meta-análisis de estudios de cohortes (Leng et al., 2015) señala que los pacientes con enfermedad periodontal tienen un riesgo significativamente alto de desarrollar enfermedad coronaria cardíaca con un riesgo relativo de 1,19 (IC 95%: 1,13-1,26). Así también, el más reciente de los meta-análisis, con 15 estudios observacionales, (Zeng et al., 2016) concluye que la enfermedad periodontal está asociada a la aterosclerosis carotídea, con un odds ratio que varía de 1,02 a 5.60.

La Federación Europea de Periodoncia en su último consenso sobre periodontitis y enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Tonetti and Van Dyke, 2013) establece que, en base a la evidencia hasta el momento, los sujetos con periodontitis presentan un riesgo significativamente mayor de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Este riesgo es substancialmente mayor para patología cerebrovascular, y se encuentra aumentado para individuos varones jóvenes. Además, establece que este riesgo añadido es independiente de otros factores de riesgo ya consolidados para la enfermedad cardiovascular.

### 3.2. Plausibilidad biológica

Investigaciones realizadas en la pasada década han demostrado que la aterosclerosis está causada, además de por los factores riesgo clásicos cardiovasculares, por nuevos factores de riesgo desconocidos (Helfand et al., 2009), entre ellos los agentes infecciosos son uno de los implicados en la patogénesis de esta enfermedad (Streblow et al., 1999, Haraszthy et al., 2000, Cannon et al., 2005).

Las enfermedades periodontales pueden predisponer a la aparición de enfermedad vascular por varios motivos, principalmente por el abundante número de **bacterias gram-negativas** involucradas (Haraszthy et al., 2000, Koren et al., 2011, Figuero et al., 2011, Reyes et al., 2013). Figuero y colaboradores en 2011 detectaron con técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la presencia de patógenos periodontales como *P. gingivalis* (78,5%) y *A. actinomycetemcomitans* (667%) en placas de ateroma humanos extraídas de pacientes sometidos a endarterectomía (Figuero et al., 2011). Según la revisión sistemática realizada por Reyes y colaboradores en 2013 hay suficiente evidencia para concluir que los patógenos periodontales llegan al sitio afectado por el ateroma (Reyes et al., 2013). Otros motivos posibles son también la producción local de lipopolisacáridos (LPS), los altos niveles detectables de citoquinas proinflamatorias, la asociación de las enfermedades periodontales con altos niveles de fibrinógeno y leucocitos, así como la cronicidad de la enfermedad (Zhang et al., 2010, Hayashi et al., 2011, Figuero et al., 2011, Schenkein and Loos, 2013). Por tanto, la carga microbiana global en un paciente con infecciones crónicas podría causar una inflamación crónica que actuase como desencadenante de la aterosclerosis. Existen varias posibles causas por las cuales las bacterias periodontales pueden inducir o acelerar la aterosclerosis (Slocum et al., 2016). Se exponen dos vías posibles de asociación (*Figura 3*):

- **Directa:** se sabe que los patógenos bacterianos del biofilm subgingival presentes en bolsas periodontales están en continuo contacto con la superficie del epitelio, una superficie expuesta estimada de entre 8 y 20 cm<sup>2</sup> (Hujoel et al., 2002), por lo que una rotura de esta barrera física puede dar lugar a una diseminación sistémica de estos microbios (bacteremia) (Reyes et al., 2013). Las actividades diarias como masticar, cepillarse los dientes o procedimientos dentales rutinarios también producen **bacteremias** (Tomas et al., 2012), pero se ha demostrado que estas alcanzan niveles más altos en los pacientes con periodontitis, pues el surco gingival es el principal portal al torrente sanguíneo para las bacterias orales (Lockhart et al., 2008, Lockhart et al., 2012). Se ha propuesto que estas

bacteremias producen un daño crónico a los vasos, contribuyendo a la lesión e inflamación que desencadena el desarrollo de aterosclerosis (Rivera et al., 2013).

En el caso de *P. gingivalis*, diferentes estudios han demostrado que esta bacteria es capaz adherirse e invadir diferentes células vasculares humanas, así como estimular la adhesión de monocitos a las células endoteliales (Hashizume et al., 2011), aumentando la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) en el endotelio (Chou et al., 2005). También, ha demostrado invadir células dendríticas y macrófagos para ganar acceso al torrente sanguíneo del paciente con enfermedad periodontal (Carrion et al., 2012).

- Indirecta: además de las propias bacterias, también se han encontrado en la circulación sistémica: antígenos, mediadores de inflamación y productos bacterianos, presentes en la bolsa periodontal. La periodontitis puede inducir de manera indirecta que la producción elevada de citoquinas y metaloproteinasas que tiene lugar en la bolsa periodontal acceda a la circulación sistémica alcanzando lugares a distancia del foco de infección inicial (Preshaw and Taylor, 2011). De forma similar, la liberación en la circulación de productos bacterianos, tales como vesículas de membrana externa, LPS, gingipainas de *P. gingivalis* (Lei et al., 2011, Jayaprakash et al., 2014) o componentes bacterianos solubles de *A. actinomycetemcomitans*, pueden inducir respuestas pro-aterogénicas en células endoteliales (Reyes et al., 2013).

Una vez se produce la invasión bacteriana, tanto las bacterias mismas como sus productos estimulan una respuesta inmune celular con la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias: IL 1, 6, 8, TNF $\alpha$ , PG-E2), y distintas MMPs, que influye en la patogenia de la aterogénesis, situando a la enfermedad periodontal como factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular (Tonetti, 2009).

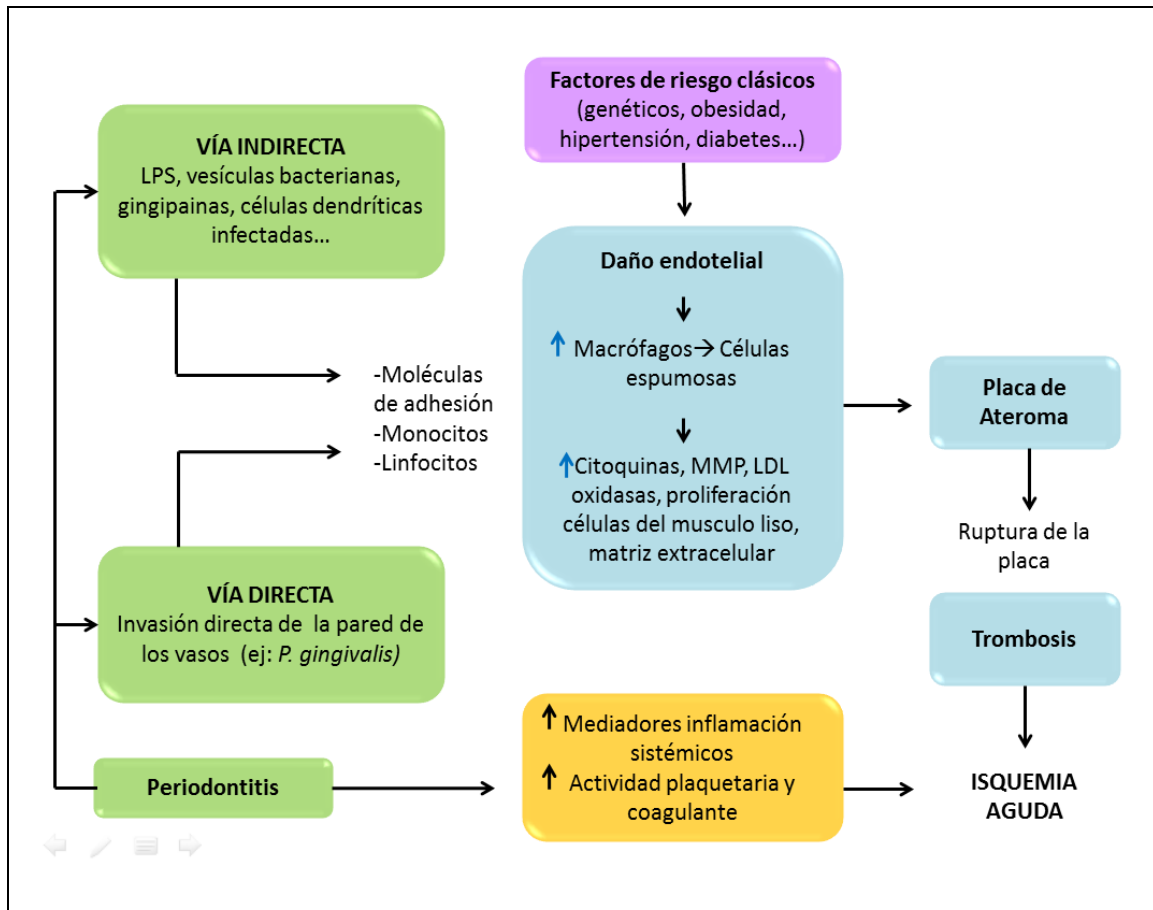


Figura 3: Posibles mecanismos de inducción de aterosclerosis por patógenos periodontales (adaptado de (De Teresa and Noguero, 2011)).

### 3.3. Estudios preclínicos in vivo

Los resultados derivados de los estudios **experimentales en animales** confirman que la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* podría favorecer la formación de placas de ateroma incrementando el riesgo de desarrollo y progresión de enfermedad cardiovascular (Chun et al., 2005). Para comprender los efectos que tiene una comunidad polimicrobiana periodontal sobre la aterosclerosis, Rivera y colaboradores en 2013 infectaron con los patógenos *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*, ratones deficientes de apolipoproteína E (ApoE-) (Rivera et al., 2013) y observaron una correlación positiva entre el número de especies detectadas por ADN bacteriano en la aorta y el tamaño de la placa de ateroma en la aorta torácica, apoyando la asociación entre la progresión de la aterosclerosis y la presencia de múltiples especies bacterianas orales.

De esta manera, la infección por *P. gingivalis* (Hayashi et al., 2011) o *A. actinomycetemcomitans* (Zhang et al., 2010) en ratones deficientes en apolipoproteína

E, ha demostrado una aceleración del proceso de aterosclerosis en estos animales. Por lo que se ha relacionado la aterosclerosis con las infecciones de la cavidad bucal a través de la activación de los receptores TLR-2 y TLR-4, receptores del sistema inmune que están también implicados en la patogénesis de la aterosclerosis (Chukkapalli et al., 2017).

### 3.4. Estudios de intervención

Actualmente, no existen en la literatura **ensayos clínicos** que puedan validar la hipótesis de que la periodontitis es un factor de riesgo independiente para el desarrollo o progresión de la enfermedad coronaria aterosclerótica. Esto es debido a que la realización de estos estudios es muy complicada, ya que la incidencia de eventos coronarios es baja en la población general y serían necesarias muestras muy amplias y periodos de seguimiento muy extendidos. Además, surgen problemas de tipo ético por la dificultad evidente de dejar a pacientes con periodontitis sin tratamiento durante largos periodos de tiempo.

Para vencer alguna de las complicaciones asociadas a la realización de este tipo de ensayos clínicos, se han realizado estudios de intervención en los que pacientes diagnosticados de periodontitis son tratados intensamente o meramente mantenidos con tratamientos preventivos. Para determinar el efecto cardiovascular se han evaluado variables subrogadas que han medido la respuesta vascular o la mejora de la inflamación sistémica. De esta manera para medir la mejora del estado hiperinflamatorio se utiliza como variable respuesta la disminución en los niveles de **proteína C-reactiva** (Vidal et al., 2009, Koppolu et al., 2013) y para medir la respuesta vascular se utiliza como marcador la mejora de la **disfunción endotelial** medida por medios físicos (Tonetti et al., 2007, Piconi et al., 2009). Partiendo de que la disfunción endotelial se define como la capacidad vasodilatadora reducida de arterias periféricas; la vasodilatación endotelial (VDE) medida en la arteria braquial evalúa mediante ultrasonidos, los cambios en el diámetro de la arteria previa y posteriormente a inducir una hiperemia reactiva mediante la oclusión del flujo sanguíneo, tratándose así de una medida fiable de la mejora de la función vascular. La VDE desempeña un papel crucial en casi todas las etapas de la aterosclerosis, por ello se ha utilizado como variable primaria en la investigación clínica sobre enfermedades cardiovasculares (Deanfield et al., 2007). Varios estudios clínicos que han utilizado esta variable respuesta han demostrado que el tratamiento periodontal mejora significativamente la función vascular (Seinost et al., 2005, Elter et al., 2006, Blum et al., 2007, Tonetti et al., 2007, Li et al., 2011). Destaca por su diseño y por su importancia el ensayo clínico publicado

por Tonetti y colaboradores en 2007, en el que el grado de mejora de la función vascular se asoció significativamente con el grado de mejora de los parámetros periodontales, que en el grupo de tratamiento intensivo fueron significativamente mejores que el grupo de tratamiento control (Tonetti et al., 2007). Sin embargo, en este estudio no se tiene en cuenta el riesgo cardiovascular previo de los pacientes incluidos, puesto que los sujetos que más se van a beneficiar del tratamiento son aquellos cuya función cardiovascular está alterada previamente. Esto sí lo han llevado a cabo en otro estudio (Offenbacher et al., 2009), aunque sin realizar mediciones de VDE. Por otra parte, también se emplea la medición del **espesor íntimo-medio carotídeo** como marcador de aterosclerosis demostrando ser un buen predictor de eventos isquémicos cardiovasculares y cerebrales (Piconi et al., 2009, Skilton et al., 2011, Toregeani et al., 2016). Piconi y colaboradores en 2009 miden el espesor la capa intima-media en la bifurcación de la carótida y obtienen una reducción significativa del espesor a los 12 meses post-tratamiento (Piconi et al., 2009).

Como se ha descrito anteriormente, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria que tiene un impacto a nivel sistémico en los niveles de marcadores de inflamación en plasma, de manera que la presencia de periodontitis se asocia con la detección de niveles elevados de proteína C reactiva en sangre (Paraskevas et al., 2008). Por otro lado, los niveles en plasma de estos biomarcadores son considerados factores predictivos de enfermedad cardiovascular (Wang and Hoy, 2010). Diferentes estudios de intervención han demostrado que el tratamiento periodontal es capaz de reducir los niveles de algunos de estos biomarcadores en plasma (Bokhari et al., 2012, Tonetti et al., 2007, Caula et al., 2014), sin embargo se desconoce con exactitud el impacto de la terapia y su posible relación directa con el estado cardiovascular de los pacientes. Todos estos estudios realizados sobre pacientes con riesgo cardiovascular presentan un limitado periodo de seguimiento (6 meses), por lo que sería razonable realizar estudios con un seguimiento más extenso.

En definitiva, se establece que el tratamiento de la periodontitis dirigido a erradicar o disminuir los niveles de ambos patógenos periodontales, podría tener un efecto beneficioso en la función cardiovascular de pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, tanto a corto como a largo plazo.

## JUSTIFICACIÓN

---

Ante la presencia de evidencia científica suficiente que apoya la asociación de las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades periodontales, y las dificultades existentes a la hora de realizar estudios de intervención que permitan evaluar los beneficios del tratamiento periodontal en la enfermedad cardiovascular, se propone el siguiente ensayo clínico de 6 meses de duración con pacientes con antecedentes de síndrome coronario agudo ocurrido hace menos de un año y con periodontitis crónica moderada-avanzada, donde el grupo test recibe tratamiento periodontal básico en 2 días consecutivos junto con enjuagues con clorhexidina durante diez días, mientras el grupo control recibe una profilaxis dental acompañado de enjuagues con flúor durante diez días.

## HIPÓTESIS

---

El tratamiento periodontal básico dirigido hacia la reducción de los niveles *de P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* a nivel subgingival es capaz de mejorar la función cardiovascular evaluada a través de la variable subrogada (VDE medida en la arteria braquial), en pacientes con periodontitis crónica y con enfermedad cardiovascular establecida.

## **OBJETIVOS**

---

### ***OBJETIVO GENERAL***

Investigar si el tratamiento periodontal básico dirigido hacia la reducción de los niveles de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* a nivel subgingival modifica la función cardiovascular en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

1. Confirmar que el tratamiento periodontal básico (RAR con anestesia) mejora los parámetros clínicos periodontales en comparación con el grupo control, a lo largo de todo el periodo de seguimiento.
2. Comparar el efecto del tratamiento periodontal básico con el del grupo control en cuanto a los niveles de VDE a lo largo de todo el periodo de seguimiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### Diseño del estudio

Se diseñó un estudio ensayo clínico aleatorizado controlado, paralelo y triple ciego que fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico de Madrid.

### Selección de la muestra

La selección de pacientes se realizó en el Servicio de Cardiología del Hospital Severo Ochoa de Leganés, con aquellos pacientes que acudían de forma secuencial a la unidad de Rehabilitación Cardíaca por padecer enfermedad cardiovascular establecida. A estos pacientes se les hizo una exploración periodontal completa a cargo de un periodoncista experimentado de la Facultad de Odontología de la UCM en el propio hospital, y se seleccionaron aquellos pacientes con periodontitis crónica moderada/avanzada generalizada que cumplían con los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

#### Criterios de inclusión:

1. Pacientes con enfermedad cardiovascular establecida: antecedentes de síndrome coronario agudo (angor inestable o infarto) en los 3 a 12 meses previos, con fracción de eyección ventricular izquierda  $\geq 50\%$ .
2. Diagnóstico de periodontitis crónica moderada/avanzada generalizada: profundidades de sondaje superiores a 5mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en al menos el 50% de los dientes (Tonetti et al., 2007).
3. Presencia de al menos 3 dientes por cuadrante.

#### Criterios de exclusión:

1. Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal en el último año.
2. Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.
3. Fumadores de 10 o más cigarrillos al día.
4. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
5. Diabetes mellitus tipo I, o tipo II con valores de hemoglobina glicosilada  $> 7$ .
6. Enfermedades periodontales necrosantes.
7. Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).
8. Toma crónica de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs).

## **Cálculo del tamaño muestral**

En base a los resultados presentados en el estudio de (Tonetti et al., 2007), se pretende encontrar una diferencia del 1% en la VDE entre ambos grupos, con una desviación estándar del 1,67%, con un riesgo alfa del 5% y una potencia del 90%. Esto implica un tamaño muestral de 48 pacientes por grupo, 96 pacientes en total. Para compensar posibles pérdidas así como para compensar el ajuste por factores de confusión en pacientes con enfermedad cardiovascular previa, se seleccionarán 120 pacientes (20% más).

En este estudio solo se presentarán los datos de los pacientes evaluados durante el curso académico 2016-17.

## **Aleatorización**

Los sujetos fueron aleatoriamente asignados a los grupos de tratamiento en orden ascendente según un sistema de distribución equilibrada a través de una tabla generada por ordenador de números aleatorios que fue realizada por una persona diferente del operador.

## **Ocultación de la asignación**

El método de ocultación de asignación seleccionado fue mediante sobres opacos, sellados y secuencialmente numerados. Estos se desvelaron al operador en el momento de comenzar el tratamiento periodontal asignado.

## **Enmascaramiento**

El enmascaramiento a triple ciego fue llevado a cabo por:

Los examinadores (variables periodontales y cardiovasculares) que fueron personas diferentes a los operadores, de tal forma, que se desconociese el tratamiento que han recibido los pacientes.

El paciente: el tratamiento se realizó sin revelar si pertenecían al grupo test o control.

En analista: que aportó la información con los nombres de los grupos ocultos.

## **Intervención**

Los procedimientos se realizaron en las clínicas del Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCM, por un operador experimentado. La intervención para el grupo test fue un tratamiento periodontal básico consistente en la realización de dos sesiones de RAR con anestesia local (US + curetas), realizadas en un intervalo de 24 horas. Además se prescribió el empleo de un colutorio de clorhexidina 0,12% (PerioAid® 0,12 tratamiento colutorio, Dentaïd, España) durante dos semanas, comenzando desde el primer día de tratamiento. Mientras que en el grupo control el tratamiento periodontal consistió en dos sesiones de tartrectomía y profilaxis (T&P) con anestesia según las necesidades del paciente, realizadas en un intervalo de 24 horas. También se prescribió el empleo de un colutorio, pero a base de fluoruro sódico 0,05% y xylitol 1,00% (Fluor-Aid® 0,05% colutorio diario, Dentaïd, España) durante dos semanas, comenzando desde el primer día de tratamiento.

Por su parte el seguimiento para ambos grupos fue el mismo. Los pacientes recibieron terapia periodontal de mantenimiento cada 3 meses una vez estabilizada la situación periodontal inicial.

Como protocolo de seguridad se estableció que aquellos pacientes en los que durante las visitas de seguimiento se observe una progresión de la enfermedad periodontal (pérdidas de inserción superiores a 2mm) serán retirados del estudio, recibirán el tratamiento periodontal oportuno y sus datos serán considerados sólo hasta ese momento.

## **Recogida de datos**

Todas las mediciones, salvo la historia médica inicial, se realizaron antes del tratamiento (basal), a los 3 y a los 6 meses después del tratamiento. Siendo la secuencia de visitas las siguientes (*Figura 4*):

- a) En el hospital se llevaron a cabo la visita 1 y las visitas 6 y 7 para medición de variables cardiovasculares.
- b) En la facultad se llevaron a cabo las visitas 2, 3, 4, 5, y las visitas 6 y 7 para medición de variables periodontales.

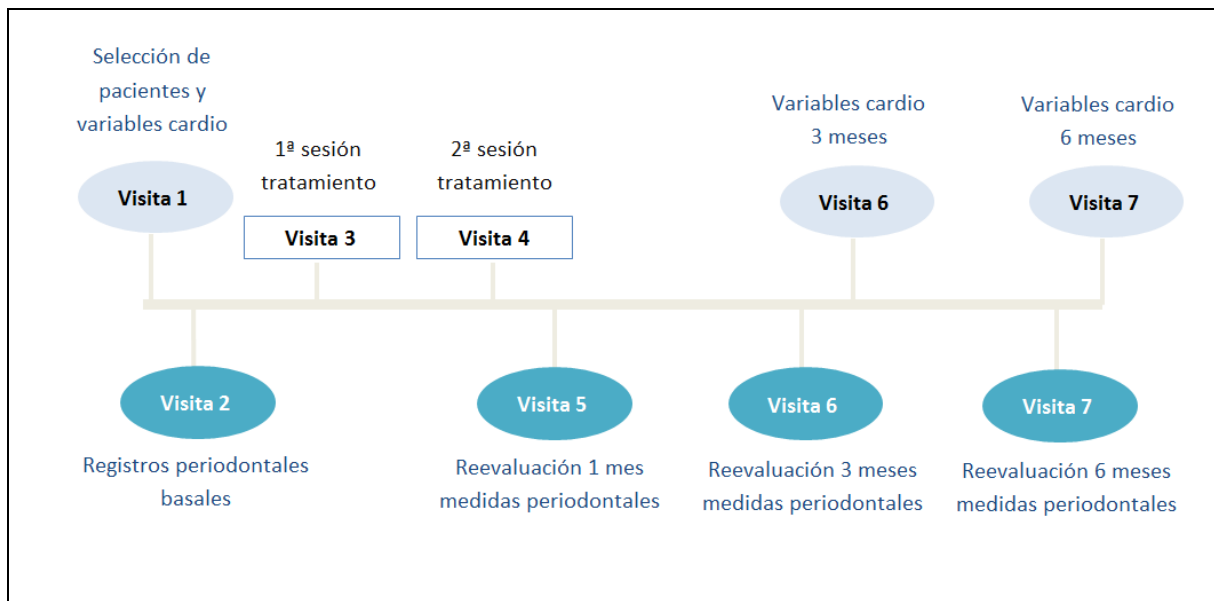


Figura 4: Esquema de la secuencia de visitas de los pacientes involucrados.

### Datos médicos generales

La historia médica completa de los pacientes se obtuvo antes del comienzo del tratamiento. Se recogieron todos los datos relativos a sexo, edad, cHDL, colesterol total, presión arterial sistólica en reposo, tabaquismo, y circunferencia abdominal, sedentarismo, postmenopausia, historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura, factores psicosociales, triglicéridos, resistencia a la insulina. Igualmente se registrará la enfermedad cardiovascular periférica o accidente cerebro vascular agudo, e información relativa a los antecedentes de síndrome coronario agudo, con o sin elevación del ST, o infarto (tratamiento recibido, colocación de stent o bypass y número de vasos con obstrucción  $\geq 50\%$ ).

### Datos clínicos periodontales

Todas las variables clínicas periodontales se registraron mediante la sonda periodontal UNC-15 (Hu-Friedy Europa, Rotterdam, Holanda) por un único examinador entrenado y calibrado en seis localizaciones por diente, en todos los dientes excepto en los terceros molares. Las variables clínicas registradas fueron las siguientes:

- Profundidad de sondaje en milímetros (distancia desde la base de la bolsa periodontal hasta el margen gingival).
- Recesión en milímetros (distancia desde el margen gingival hasta el límite amelocementario).
- Índice de placa (presente/ausente).

- d. Sangrado al sondaje como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- e. Índice de supuración (presente/ausente).
- f. Número de dientes presentes.

### **Mediciones cardiovasculares**

Para la determinación de la función vascular dos examinadores entrenados y calibrados, pertenecientes al Servicio de Cardiología (Hospital Severo Ochoa de Leganés), realizaron la medición de la VDE de la arteria braquial mediante ultrasonidos (Vivid E9, GE Healthcare) con una sonda lineal de 7 MHz (Sonda 9L General Electrics Medical Systems) y de forma automática (Brachial Tools, version 3.2.6, Medical ImagingApplications) en respuesta a una presión arterial de 250 mmHg durante 5 minutos ejercida con un esfigmomanómetro. La dilatación se cuantificó como el cambio, expresado en porcentaje (%), desde basal al pico del diámetro entre 45 y 60 segundos tras eliminar la presión.

### **Análisis estadístico**

La variable respuesta primaria es la VDE en la arteria braquial (porcentaje de cambio en el diámetro de la arteria braquial tras insuflar flujo). Y como variables respuesta secundarias se consideraron: edad, sexo, antecedentes familiares cardiovasculares, presión sanguínea sistólica, colesterol, triglicéridos, profundidad de sondaje, recesión, índice de placa y sangrado al sondaje.

Se ha comprobado la distribución de la muestra mediante diagramas de caja y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se ha realizado una comparación de medias mediante el test U-Mann Whitney, para variables cuantitativas continuas y prueba de Chi cuadrado para variables categóricas, para comparar ambos grupos en la visita basal, y en la de los 6 meses y para evaluar los cambios entre la visita basal y 6 meses. Se ha empleado el programa estadístico SPSS (v21, IBM), y se ha considerado que los valores de  $p < 0,05$  son estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### Descripción de la muestra

Hasta el momento la selección de pacientes se ha llevado a cabo en el periodo febrero 2016 – Junio 2017, con una inclusión total de 20 pacientes, de aproximadamente 85 pacientes evaluados en *screening*. El grupo test cuenta actualmente con 8 pacientes, mientras que el grupo control es de 12 pacientes.

De estos 20 pacientes, solo dos faltan por terminar el tratamiento y por tanto el estudio. De momento el estudio cuenta con tres abandonos de pacientes que no han terminado el tratamiento, bien porque ha sido imposible volver a contactar con ellos, o porque han recibido tratamiento antibiótico en el periodo de estudio, siendo este un criterio de exclusión.

### Datos médicos

En la *Tabla 1* se muestran los datos referentes a los factores de riesgo cardiovascular de cada paciente medidos al inicio del estudio, obtenidos de test no paramétricos. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En ambos grupos se observa que la media de años fumando ha sido superior a 20 (test: 29,63; SD: 14,66 vs Control: 20,42; SD: 13,10;  $p > 0,05$ ), así como el perímetro abdominal es superior a 103 cm (103; SD: 9,49 vs 106,56; SD: 16,35;  $p > 0,05$ ).

Nombre Variable	Valor grupo Test				Valor grupo Control				Valor de p
	Mediana	IR	Media	SD	Mediana	IR	Media	SD	
Años fumando	35	19	29,63	14,66	23,5	25	20,42	13,10	0,057
Cigarrillos/día	13	29	18,25	20,74	10	19	12	11	0,624
Colesterol total (mg/dL)	133	40	138	19,66	123,5	56	133,67	45,57	0,384
cHDL (mg/dL)	34	13	38,86	12,23	37	13	38,92	11,62	0,967
Triglicéridos (mg/dL)	123	120	137,29	64,80	77,5	46	89,58	33,33	0,068
Tensión arterial (mmHg)	136,5	36	133,50	19,46	131	31	129,17	15,91	0,699
Peso (kg)	75,1	86,3	57,29	40,07	84	20,5	88,63	20,63	0,174
Altura (m)	1,75	0,13	1,47	0,65	1,75	82,22	40,25	76,53	0,142
Circunferencia abdominal (cm)	105	15	103	9,49	103	14	106,56	16,35	0,797
Nº SCA	1	1	0,88	0,99	1	1	0,83	1,12	0,851
Nº vasos obstruidos	0,5	1	0,63	0,74	1	1	1,33	0,99	0,135

*Tabla 1: Datos médicos generales variables cuantitativas. SCA (Síndrome Coronario Agudo), SD (Desviación estándar), IR (Rango intercuartílico).*

En la *Tabla 2* se pueden ver los datos referentes a las variables cualitativas de este estudio. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre los grupos control y test en cuanto a estas variables. Destaca que, de los 20 pacientes estudiados, sólo hay una mujer, así como sólo un paciente presenta resistencia a la insulina.

Nombre Variable		Valor grupo Test		Valor grupo Control		Valor de p
		n	%	n	%	
Sexo	H	8	100	11	91,7	,402
	M	0	0	1	8,3	
Tabaco	No	6	75	11	91,7	,306
	Si	2	25	1	8,3	
Estrés	No	2	25	5	41,7	,444
	Si	6	75	7	58,3	
Alergias	No	6	75	10	83,3	,648
	Si	2	25	2	16,7	
Resistencia a la insulina	No	8	100	9	90,0	,357
	Si	0	0	1	10,0	
Sedentarismo	No	3	37,5	6	50,0	,582
	Si	5	62,5	6	50,0	
Postmenopausia	No	8	100	11	91,7	,402
	Si	0	0	1	8,3	
Hª familiar de ECV	No	3	37,5	7	58,3	,361
	Si	5	62,5	5	41,7	
Factores psicosociales	No	8	100	9	75,0	,125
	Si	0	0	3	25,0	
Bypass	No	7	87,5	11	91,7	,761
	Si	1	12,5	1	8,3	
Stent	No	3	37,5	3	25,0	,550
	Si	5	62,5	9	75,0	

*Tabla 2: Datos médicos generales variables cualitativas.  
H (hombres), M (mujeres), ECV (Enfermedad Cardiovascular).*

### Datos periodontales

En la *Tabla 3 y 4* se agrupa toda la información acerca del estado y evolución periodontal de cada paciente.

En la *Tabla 3* se pueden apreciar los parámetros descriptivos para cada variable periodontal, previos y posteriores al tratamiento. De este modo es posible observar la evolución de cada parámetro periodontal desde la visita basal hasta los 6 meses.

En ambos grupos los niveles de placa se ven reducidos al final del estudio en comparación con los valores iniciales (0,74 basal a 0,50 en 6 meses en grupo test vs 0,84 a 0,54 en grupo control;  $p>0,05$ ). En el grupo test todos los parámetros periodontales presentan una mejoría a final del estudio siendo las diferencias en la profundidad de sondaje con respecto al grupo control, estadísticamente significativas en todas las visitas pasando de una media 3,74 en basal a 2,91 en 6 meses para el grupo test vs 4,24 en basal a 3,66 en 6 meses en el grupo control ( $p<0,05$ ). En la visita a 1 mes se observa una mejoría estadísticamente significativa en el sangrado al sondaje en el grupo test frente al control.

Nombre Variable	Valor grupo Test					Valor grupo Control					Valor de p	
	n	Mediana	IR	Media	SD	n	Mediana	IR	Media	SD		
IP	Basal	8	0,83	0,40	0,74	0,26	11	0,91	0,18	0,83	0,15	0,492
	1 Mes	7	0,28	0,14	0,28	0,10	10	0,53	0,40	0,50	0,24	0,07
	3 Meses	6	0,41	0,45	0,40	0,24	8	0,57	0,18	0,57	0,15	0,181
	6 Meses	6	0,46	0,37	0,50	0,23	8	0,52	0,37	0,54	0,23	0,755
Rec	Basal	8	0,67	0,45	0,76	0,57	11	0,74	0,98	1,03	0,89	0,492
	1 Mes	7	0,91	0,58	1,05	0,36	10	1,09	0,92	1,25	0,83	0,962
	3 Meses	6	0,82	0,55	1,04	0,65	8	0,98	1,50	1,18	0,94	0,852
	6 Meses	6	0,58	0,44	0,61	0,24	8	0,89	1,41	1,18	0,99	0,491
PS	Basal	8	3,56	0,53	3,74	0,38	11	4,22	0,53	4,24	0,53	0,02
	1 Mes	7	2,73	0,41	2,76	0,30	10	3,62	0,84	3,57	0,64	0,003
	3 Meses	6	2,79	0,60	2,77	0,35	8	3,52	0,60	3,62	0,51	0,003
	6 Meses	6	2,94	0,57	2,91	0,33	8	3,55	1,01	3,66	0,77	0,029
SaS	Basal	8	0,54	0,14	0,54	0,10	11	0,64	0,40	0,59	0,24	0,31
	1 Mes	7	0,25	0,11	0,24	0,11	10	0,39	0,46	0,48	0,25	0,019
	3 Meses	6	0,30	0,32	0,28	0,15	8	0,51	0,35	0,47	0,21	0,142
	6 Meses	6	0,35	0,26	0,32	0,13	8	0,44	0,50	0,45	0,24	0,491
Sup	Basal	8	0,00	0,01	0,00	0,00	11	0,00	0,01	0,01	0,02	0,657
	1 Mes	7	0,00	0,01	0,01	0,02	10	0,01	0,03	0,01	0,01	0,315
	3 Meses	6	0,01	0,00	0,01	0,00	8	0,00	0,01	0,01	0,02	0,345
	6 Meses	6					8	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02

Tabla 3: Parámetros clínicos periodontales; Pre- y Post-tratamiento. IP (Índice de Placa), Rec (Recesión), PS (Profundidad de Sondaje), SaS (Sangrado al Sondaje), Sup (Supuración).

En la *Tabla 4* se observa la evolución en las medidas periodontales producida entre las visitas: basal, 3 meses y 6 meses. No hay diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, sin embargo, a diferencia del grupo control, en el grupo test el cambio que se produce de basal a 3 meses se observa que en términos absolutos es mejor para todas las variables.

Nombre Variable	Valor grupo Test			Valor grupo Control			Valor de p	
	n	Media	SD	n	Media	SD		
Rec	cambio Basal-6 Meses	6	0,08	0,16	8	0,14	0,24	,641
	cambio Basal-3 Meses	6	0,23	0,25	8	0,13	0,28	,522
	cambio 3 Meses-6 Meses	5	-0,14	0,29	8	0,01	0,15	,238
PS	cambio Basal-6 Meses	6	-0,73	0,24	8	-0,67	-0,67	,795
	cambio Basal-3 Meses	6	-0,89	0,26	8	-0,71	0,27	,228
	cambio 3 Meses-6 Meses	5	0,05	0,32	8	0,04	0,38	,970
IP (%)	cambio Basal-6 Meses	6	-19,48	20,66	8	-27,18	22,12	,520
	cambio Basal-3 Meses	6	-28,75	17,51	8	-23,65	17,72	,602
	cambio 3 Meses-6 Meses	5	8,69	10,66	8	-3,53	14,71	,137
SaS (%)	cambio Basal-6 Meses	6	-22,21	15,15	8	-16,47	0,19	,560
	cambio Basal-3 Meses	6	-25,32	18,40	8	-14,21	13,30	,213
	cambio 3 Meses-6 Meses	5	-2,99	14,43	8	-2,26	11,09	,920
Sup (%)	cambio Basal-6 Meses	6	-0,34	0,37	8	-0,41	2,63	,950
	cambio Basal-3 Meses	6	0,35	0,39	8	-0,45	1,85	,320
	cambio 3 Meses-6 Meses	5	-0,53	0,30	8	0,04	2,17	,574

Tabla 4: Evolución medidas clínicas periodontales.

### Datos cardiovasculares

En la *Tabla 5 y 6* se recogen los datos sobre de las mediciones cardiovasculares realizadas, su evolución y cambios de una visita a otra.

En la *Tabla 5* se pueden ver los valores de la VDE medidos previos y posteriores al tratamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque el grupo test comienza el estudio con valores de VDE menores que el grupo control (12,35 vs 16,13;  $p > 0,05$ ) y estos valores menores se mantienen hasta los 6 meses (6,69 vs 14,29;  $p < 0,05$ ), con una clara reducción en los valores de VDE a lo largo del tiempo.

Nombre Variable	Valor grupo Test					Valor grupo Control					Valor de p
	n	Mediana	IR	Media	SD	n	Mediana	IR	Media	SD	
VDE Basal	8	12,35	11,14	12,40	5,66	11	16,13	15,75	17,67	8,33	0,272
3 Meses	7	10,81	6,75	10,95	5,63	9	17,50	16,31	15,03	8,12	0,536
6 Meses	6	6,69	17,53	12,15	10,17	7	14,29	6,73	12,83	3,53	0,445

Tabla 5: Vasodilatación endotelial; pre- y post- tratamiento. VDE (Vasodilatación Endotelial).

En la *Tabla 6* se observa la evolución en las mediciones de la función endotelial entre las visitas: basal, 3 meses y 6 meses. El cambio en la VDE no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, observándose en ambos grupos una reducción en los valores de VDE entre basal y 6 meses más marcada en el grupo control.

Nombre Variable	Valor grupo Test			Valor grupo Control			Valor de p
	n	Media	SD	n	Media	SD	
VDE cambio Basal-6 Meses	6	-0,37	10,94	7	-8,11	9,40	,197
cambio Basal-3 Meses	7	-2,57	8,77	9	-4,87	10,05	,639
cambio 3 Meses-6 Meses	6	-0,23	6,41	7	-0,43	8,60	,965

*Tabla 6: Evolución medidas vasculares.*

## DISCUSIÓN

---

El objetivo de este estudio ha sido investigar si el tratamiento periodontal básico encaminado a la reducción de los niveles de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* a nivel subgingival mejora la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

En nuestro estudio se observa que los pacientes con periodontitis moderada-avanzada sometidos a un tratamiento periodontal básico en dos días consecutivos experimentan un empeoramiento de la función endotelial, a 3 y 6 meses post-tratamiento, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Evidencia reciente en este campo de investigación muestra que el tratamiento periodontal puede mejorar significativamente la función endotelial (Blum et al., 2007, Tonetti et al., 2007, Piconi et al., 2009), pero el último de los ensayos clínicos publicado en 2011 que evalúa la función endotelial (Li et al., 2011) concluye que el tratamiento periodontal tiene un efecto neutral en la función endotelial periférica.

La **disfunción endotelial** es una manifestación temprana en la patogénesis de la aterosclerosis, en respuesta a una serie de factores de riesgo que han demostrado predecir los distintos desenlaces de la enfermedad cardiovascular en estudios epidemiológicos (Khazaei et al., 2008, Martin and Anderson, 2009). La disfunción endotelial se asocia a un peor pronóstico en la fase clínica de la aterosclerosis (Matsuzawa et al., 2015) además, un meta-análisis reciente revela que para cada punto de disminución de la VDE, el riesgo de enfermedad cardiovascular futuro aumenta un 10% (Ras et al., 2013), por lo que la utilización de la VDE medida en la arteria braquial, como una variable respuesta subrogada de la aterosclerosis es una herramienta válida para evaluar las nuevas estrategias encaminadas a reducir los factores de riesgo cardiovasculares (Deanfield et al., 2007, Fadini et al., 2010). Es por todo ello que en este ensayo clínico, se ha medido la VDE en la arteria braquial pero existen otros métodos alternativos también válidos para determinar la disfunción endotelial, como el índice PAT (*Peripheral Arterial Tonometry*) que evalúa la función endotelial periférica mediante la aplicación de una hiperemia reactiva en las yemas de los dedos (Li et al., 2011). Se ha demostrado que el índice PAT se correlaciona significativamente con la VDE braquial y predice eventos de enfermedad

cardiovascular (Hamburg and Benjamin, 2009). Aunque, cabe señalar que la respuesta de hiperemia que ofrece el índice PAT refleja en gran medida las respuestas vasodilatadoras de la microvasculatura digital, pero no proporciona la información equivalente de los conductos arteriales que si ofrece la medición de la VDE en la arteria braquial.

El presente estudio piloto tiene en común con los estudios que obtienen resultados significativos (Seinost et al., 2005, Elter et al., 2006, Blum et al., 2007, Tonetti et al., 2007, Piconi et al., 2009), que todos evaluamos la función endotelial mediante la VDE medida en la arteria braquial. Por otra parte, en las diferencias de los resultados obtenidos, entre nuestro estudio y los demás, se han analizado varios aspectos: la duración de los ensayos clínicos, el tamaño muestral, los criterios de inclusión y exclusión establecidos y las diferencias en los tratamientos administrados a cada grupo de estudio. Además, también se ha revisado el método de evaluación de la VDE en los diferentes estudios publicados.

En cuanto al **tiempo de seguimiento**, en los ensayos clínicos publicados que han evaluado la función vascular endotelial, varía de 1 a 12 meses, siendo el que evalúa los cambios a un mes, un estudio piloto (Elter et al., 2006), lo que evalúan a tres meses (Seinost et al., 2005, Blum et al., 2007, Li et al., 2011), a 6 meses (Tonetti et al., 2007) y a 12 meses (Piconi et al., 2009). Nuestro estudio evalúa los cambios producidos en la VDE a los 3 y a los 6 meses, una duración que en comparación con los demás estudios, es suficiente para observar cambios significativos. Aunque sin duda, un mayor periodo de seguimiento aportaría mayor fiabilidad a los resultados.

Además, hemos observado como los cambios producidos en los parámetros periodontales, entre la visita basal y la visita a los 3 meses, son mejores que los cambios observados entre la basal y 6 meses, esto lo atribuimos al efecto Hawthorne que sesga los resultados por la motivación que presentan los pacientes en los primeros meses, por el mero hecho de verse participando en una investigación. Puesto que una medida para evitar este sesgo es establecer un tiempo de seguimiento superior, los resultados a seis meses serían más fiables. Así mismo, está claro que el tratamiento periodontal ha tenido un efecto positivo a nivel periodontal en el grupo test ya que en la primera reevaluación, presentaba una mejoría estadísticamente significativa en el sangrado al sondaje, que no se observó en las posteriores visitas, probablemente por la disminución en el tiempo dedicado a control de placa por parte de los pacientes.

Por otro lado, el **tamaño muestral** es esencial a la hora de establecer diferencias estadísticamente significativas. En los estudios publicados, varía de 22 a 120 sujetos evaluados. Destaca el, previamente mencionado, estudio de Tonetti y colaboradores en 2007, con una muestra de 120 pacientes de los que 61 fueron tratados experimentalmente (Tonetti et al., 2007). El cálculo muestral de nuestro estudio se ha realizado en base a la desviación estándar del estudio de Tonetti y cols. en 2007, por ello el objetivo es alcanzar un tamaño muestral de 120 pacientes para poder establecer diferencias significativas. El presente estudio piloto cuenta con 20 pacientes (8 en el grupo test), por lo que es comprensible que los resultados obtenidos no sean los esperados.

A la hora de evaluar los **criterios de inclusión y exclusión** de los estudios, es importante valorar los criterios establecidos para diagnosticar a un paciente de periodontitis. En nuestro estudio se han incluido pacientes con profundidades de sondaje superiores a 5 mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en al menos el 50% de los dientes (Tonetti et al., 2007) con la presencia de al menos 3 dientes por cuadrante. Mientras que en otros estudios los criterios han sido diferentes. Destacan dos estudios con resultados significativos, por un lado, el estudio de Piconi y cols. en 2009 donde observamos que no se define qué valoran cómo periodontitis leve o moderada (Piconi et al., 2009). Con lo cual, comparar los resultados del presente estudio piloto con el de Piconi y cols. 2009, podría significar subestimar el diseño y fiabilidad de nuestro estudio que consideramos más riguroso metodológicamente.

Continuando con el análisis de los criterios de inclusión y exclusión llama la atención que en varios de los estudios publicados con resultados significativos (Seinost et al., 2005, Elter et al., 2006, Blum et al., 2007, Piconi et al., 2009, Li et al., 2011), se establecía como criterio de exclusión que los pacientes tuvieran historia previa de enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes o colesterol alto. Factores que nosotros hemos incluido en nuestro estudio, tratando de poder aplicar los resultados de esta investigación a una población diana real, de manera que la muestra fuera lo más representativa posible. Únicamente, Tonetti y cols. en 2007 evalúa pacientes con historia previa de enfermedad cardiovascular.

Dos aspectos importantes a tener en cuenta entre los diferentes ensayos clínicos publicados son, por un lado, el **diseño del estudio**, es decir, si el ensayo clínico es controlado paralelo o cruzado y por otro lado, cuál ha sido el **tratamiento**

**administrado** al grupo experimental (RAR en 2 sesiones consecutivas o en 2 semanas, prescripción de clorhexidina como coadyuvante y/o de antibióticos...).

Los estudios que utilizan a los mismos pacientes a los que aplican el tratamiento periodontal como controles, estableciendo comparaciones en el tiempo con la situación previa y posterior al tratamiento son Elter et al., 2006 y Piconi et al., 2009. Por lo que las comparaciones directas con estos dos estudios estarían sesgadas por las diferencias en el diseño del estudio. Nuestro caso, al igual que el de Tonetti y cols., en 2007, es un ensayo clínico controlado paralelo, que aplica dos tipos de tratamiento diferentes a cada grupo, a pesar de que lo ideal sería comparar con sujetos que no recibiesen tratamiento periodontal pero hoy día esto no sería ético. Destaca el estudio de Li y cols. en 2011, que tras realizar el tratamiento en el grupo test y acabar el periodo de estudio (3 meses), es decir, después haber hecho las comparaciones entre los grupos (tratados vs no tratados), entonces, sí trata periodontalmente a los pacientes del grupo control. Quizás este estudio sea posible debido a la corta duración del seguimiento. Del mismo modo, hay estudios que, en lugar de comparar con sujetos con periodontitis, comparan con sujetos sanos (Seinost et al., 2005, Blum et al., 2007).

En cuanto a las diferentes terapias periodontales administradas, hay diferentes protocolos, lo que dificulta una vez más la comparación y discusión entre estudios. En el presente estudio piloto, el grupo test recibió un tratamiento periodontal básico en dos sesiones consecutivas de RAR tanto con instrumentos manuales como ultrasónicos, además se prescribió enjuagues con clorhexidina durante 10 días, a diferencia del grupo control que únicamente recibió una profilaxis y enjuagues con flúor, además de recibir ambos grupos instrucciones de higiene oral (IHO). Un protocolo parecido utilizaron Seinost y cols., en 2005, Tonetti y cols., en 2007 y Li y cols., en 2011. En el primero, el tratamiento también se realizaba en dos sesiones de RAR junto con IHO y enjuagues de clorhexidina, además se prescribieron antibióticos sistémicos (amoxicilina junto con ácido clavulánico y metronidazol). El segundo de los estudios mencionados realizó en el grupo experimental un tratamiento intensivo de RAR a boca completa aplicando microesferas de minociclina de forma tópica en las bolsas periodontales. Por último Li y cols., en 2011, realizaron un tratamiento consistente en dos o tres sesiones de RAR en el plazo máximo de una semana, con la aplicación tópica de clorhexidina en las bolsas periodontales mayores de 4 mm y enjuagues. A pesar de las pequeñas variaciones entre los protocolos de estos estudios y el nuestro, si se podrían establecer comparaciones de los resultados obtenidos.

Con respecto a las **limitaciones** que presenta este estudio, cabe mencionar que lo ideal habría sido comparar el efecto del tratamiento periodontal básico en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, frente a un grupo control, con enfermedad cardiovascular, que no recibiese ningún tipo de tratamiento periodontal, y así evaluar el efecto absoluto de la terapia periodontal en las variables subrogadas de riesgo cardiovascular. Esto no sería ético por la imposibilidad de dejar a un paciente que padece enfermedad periodontal moderad-avanzada sin tratamiento durante los 6 meses de seguimiento del estudio.

Por otro lado, también habría sido ideal poder presentar en el este estudio piloto información acerca de los cambios producidos en los mediadores de inflamación de los pacientes incluidos. Los datos que se presentan aquí forman parte de un ensayo clínico más amplio donde estos datos serán tenidos en cuenta. Según el último de los meta-análisis que evalúa la reducción de los marcadores de la inflamación predictivos de enfermedad aterosclerótica (niveles proteína C reactiva o fibrinógeno en sangre) tras la terapia periodontal (Teeuw et al., 2014), concluye que el tratamiento periodontal efectivamente mejora los niveles de proteína C reactiva y otros mediadores de inflamación, especialmente en individuos que padecen enfermedad periodontal avanzada y comorbilidades como la enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus. Este hecho, es clínicamente relevante, pues los niveles de proteína C reactiva exhiben una asociación continua con el riesgo de infarto de miocardio o cerebral (Kaptoge et al., 2010), siendo un importante factor de riesgo de la enfermedad aterosclerótica (Buckley et al., 2009).

Por último, creemos que una limitación importante de este estudio piloto es la reducida muestra que se presenta, siendo los resultados no significativos, pues el cálculo muestral que se realizó persigue estudiar a 120 sujetos.

Así mismo, nuestro estudio también posee una serie de **fortalezas** tales como el rigor metodológico con el que ha sido diseñado y ejecutado, basado en la evidencia científica existente hasta el momento para cada variable medida y cada protocolo seguido, confiriéndole a esta investigación reproducibilidad y fiabilidad. Del mismo modo, los criterios de inclusión empleados permiten extrapolar los resultados a la población diana, pues la muestra seleccionada representa fielmente a los pacientes que más podrían beneficiarse de los hallazgos de esta investigación.

## **CONCLUSIONES**

---

Teniendo en cuenta las limitaciones del presente trabajo, se puede concluir que:

- En pacientes con enfermedad cardiovascular establecida y periodontitis crónica moderada-severa, no existen diferencias estadísticamente significativas en el grado de vasodilatación endotelial al comparar el tratamiento periodontal básico intensivo (RAR junto con el uso coadyuvante de clorhexidina) con la realización de una profilaxis supragingival.
- Es necesario continuar el estudio hasta alcanzar el tamaño muestral final para poder evaluar los objetivos principales de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AAP 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 926-32.
- Armitage, G. C. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*, 4.
- Baheni, P. & Tonetti, M. S. 2010. Conclusions and consensus statements on periodontal health, policy and education in Europe: a call for action--consensus view 1. Consensus report of the 1st European Workshop on Periodontal Education. *Eur J Dent Educ*, 14 Suppl 1, 2-3.
- Bahekar, A. A., Singh, S., Saha, S., Molinar, J. & Arora, R. 2007. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J*, 154, 830-7.
- Beck, J. D. & Offenbacher, S. 2005. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*, 76, 2089-100.
- Blaizot, A., Vergnes, J. N., Nuwwareh, S., Amar, J. & Sixou, M. 2009. Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *Int Dent J*, 59, 197-209.
- Blum, A., Kryuger, K., Mashiach Eizenberg, M., Tatour, S., Vigder, F., Laster, Z. & Front, E. 2007. Periodontal care may improve endothelial function. *Eur J Intern Med*, 18, 295-8.
- Bokhari, S. A., Khan, A. A., Butt, A. K., Azhar, M., Hanif, M., Izhar, M. & Tatakis, D. N. 2012. Non-surgical periodontal therapy reduces coronary heart disease risk markers: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*, 39, 1065-74.
- Braunwald, E. 1996. Acute myocardial infarction--the value of being prepared. *N Engl J Med*, 334, 51-2.
- Buckley, D. I., Fu, R., Freeman, M., Rogers, K. & Helfand, M. 2009. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 151, 483-95.
- Calapkorur, M. U., Alkan, B. A., Tasdemir, Z., Akcali, Y. & Saatci, E. 2016. Association of peripheral arterial disease with periodontal disease: analysis of inflammatory cytokines and an acute phase protein in gingival crevicular fluid and serum. *J Periodontal Res*, 1-8.
- Cannon, C. P., Braunwald, E., McCabe, C. H., Grayston, J. T., Muhlestein, B., Giugliano, R. P., Cairns, R. & Skene, A. M. 2005. Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome. *N Engl J Med*, 352, 1646-54.

- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernandez-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, 548-56.
- Carrion, J., Scisci, E., Miles, B., Sabino, G. J., Zeituni, A. E., Gu, Y., Bear, A., Genco, C. A., Brown, D. L. & Cutler, C. W. 2012. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J Immunol*, 189, 3178-87.
- Castro Lara, J., Ibero Sagastibela. I., Bascones Martínez, A. 2001. ¿Es la enfermedad periodontal un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares? (I) Etiopatogenia y ensayos clinicos. *Avances en periodoncia*, 13, 65-75.
- Caula, A. L., Lira-Junior, R., Tinoco, E. M. & Fischer, R. G. 2014. The effect of periodontal therapy on cardiovascular risk markers: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 41, 875-82.
- Cobb, C. M. 1996. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol*, 1, 443-90.
- Chapple, I. L. & Genco, R. 2013. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S106-12.
- Chou, H. H., Yumoto, H., Davey, M., Takahashi, Y., Miyamoto, T., Gibson, F. C. 3<sup>rd</sup> & Genco, C. A. 2005. Porphyromonas gingivalis fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun*, 73, 5367-78.
- Chukkapalli, S. S., Velsko, I. M., Rivera-Kweh, M. F., Larjava, H., Lucas, A. R. & Kesavalu, L. 2017. Global TLR2 and 4 deficiency in mice impacts bone resorption, inflammatory markers and atherosclerosis to polymicrobial infection. *Mol Oral Microbiol*, 32, 211-225.
- Chun, Y. H., Chun, K. R., Olguin, D. & Wang, H. L. 2005. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodontal Res*, 40, 87-95.
- De Teresa, E., López Salguero, J. R., Molero, E. & Cruz, J. M. 2003. Formas de presentación clínica de la cardiopatía isquémica. Angina estable, angina inestable e infarto de miocardio. In: De Teresa, E. (ed.) *Miocardopatía isquémica*. Madrid: Cardiología en Atención Primaria. Aula Medica Ediciones.
- De Teresa, E. & Noguero, B. 2011. Inflamación y cardiopatía isquémica. In: PANAMERICANA, E. M. (ed.) *Patología Periodontal y Cardiovascular*. Madrid: SEPA y SEC.

- Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Rabelink, T. J. 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115, 1285-95.
- Elter, J. R., Hinderliter, A. L., Offenbacher, S., Beck, J. D., Caughey, M., Brodala, N. & Madianos, P. N. 2006. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *Am Heart J*, 151, 47.
- Fadini, G. P., Pagano, C., Baesso, I., Kotsafti, O., Doro, D., De Kreutzenberg, S. V., Avogaro, A., Agostini, C. & Dorigo, M. T. 2010. Reduced endothelial progenitor cells and brachial artery flow-mediated dilation as evidence of endothelial dysfunction in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol*, 88, 135-41.
- Figuero, E., Lindahl, C., Marin, M. J., Renvert, S., Herrera, D., Ohlsson, O., Wetterling, T. & Sanz, M. 2014. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *J Periodontol*, 85, 1182-93.
- Figuero, E., Sánchez-Beltrán, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J. M., Del Castro, J. A., Gutiérrez, J. M., Herrera, D. & Sanz, M. 2011. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 82, 1469-77.
- Fuster, V. 1994. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*, 90, 2126-46.
- Gunsolley, J. C. 2006. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc*, 137, 1649-57.
- Gunsolley, J. C. 2010. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*, 38 Suppl 1, S6-10.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 78-111.
- Hajishengalis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., McIntosh, M. L., Alsam, A., Kirkwood, K. L., Lambris, J. D., Darveau, R. P. & Curtis, M. A. 2011. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, 10, 497-506.
- Hamburg, N. M. & Benjamin, E. J. 2009. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med*, 19, 6-11.

- Haraszthy, V. I., Zambon, J. J., Trevisan, M., Zeid, M. & Genco, R. J. 2000. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 71, 1554-60.
- Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T. & Yamamoto, M. 2011. Porphyromonas gingivalis stimulates monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62, 57-65.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. 2008. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371, 237-42.
- Hayashi, C., Viereck, J., Hua, N., Phinikaridou, A., Madrigal, A. G., Gibson, F. C. 3<sup>rd</sup> Hamilton, J. A. & Genco, C. A. 2011. Porphyromonas gingivalis accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*, 215, 52-9.
- Helfand, M., Buckley, D. I., Freeman, M., FU, R., Rogers, K., Fleming, C. & Humphrey, L. L. 2009. Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 151, 496-507.
- Hujoel, P. P., Drangsholt, M., Spiekerman, C. & Derouen, T. A. 2002. Periodontitis-systemic disease associations in the presence of smoking--causal or coincidental? *Periodontol 2000*, 30, 51-60.
- Ide, M., McPartlin, D., Coward, P. Y., Crook, M., Lumb, P. & Wilson, R. F. 2003. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol*, 30, 334-40.
- James, P., Worthington, H. V., Parnell, C., Harding, M., Lamont, T., Cheung, A., Whelton, H. & Riley, P. 2017. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- Jayaprakash, K., Khalaf, H. & Bengtsson, T. 2014. Gingipains from Porphyromonas gingivalis play a significant role in induction and regulation of CXCL8 in THP-1 cells. *BMC Microbiol*, 14, 193.
- Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Lowe, G., Pepys, M. B., Thompson, S. G., Collins, R. & Danesh, J. 2010. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*, 375, 132-40.

- Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. & Marcenes, W. 2014. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, 93, 1045-53.
- Khazaei, M., Moien-Afshari, F. & Laher, I. 2008. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*, 15, 49-67.
- Koppolu, P., Durvasula, S., Palaparthy, R., Rao, M., Sagar, V., Reddy, S. K. & Lingam, S. 2013. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *Pan Afr Med J*, 15, 1-10.
- Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C. J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R. E. & Backhed, F. 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4592-8.
- Korman, K. S. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 79, 1560-8.
- Lang, N. P., Bartold, M., Cullinan, M., Jeffcoat, M., Mombelli, A., Murakami, S., Page, R. C., Papapanou, P. N., Tonetti, M. & Van Dyke, T. E. 1999. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4.
- Lang, N. P., Tan, W. C., Krahenmann, M. A. & Zwahlen, M. 2008. A systematic review of the effects of full-mouth debridement with and without antiseptics in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 35, 8-21.
- Lei, L., Li, H., Yan, F., Li, Y. & Xiao, Y. 2011. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide alters atherosclerotic-related gene expression in oxidized low-density-lipoprotein-induced macrophages and foam cells. *J Periodontal Res*, 46, 427-37.
- Leng, W. D., Zeng, X. T., Kwong, J. S. & Hua, X. P. 2015. Periodontal disease and risk of coronary heart disease: An updated meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol*, 201, 469-72.
- Li, X., Tse, H. F., Yiu, K. H., Li, L. S. & Jin, L. 2011. Effect of periodontal treatment on circulating CD34(+) cells and peripheral vascular endothelial function: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*, 38, 148-56.
- Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-43.
- Lindhe, J., Ranney, R., Lamster, I., Charles, A., Chung, C. P., Flemming, T., Kinane, D., Listgarten, M., Löe, H., Schoor, R., Seymour, G. & Somerman, M. 1999. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4.

- Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papapanou, P. N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M. E., Taubert, K. A., Newburger, J. W., Gornik, H. L., Gewitz, M. H., Wilson, W. R., Smith, S. C. Jr. & Baddour, L. M. 2012. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 125, 2520-44.
- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J. & Bahrani-Mougeout, F. K. 2008. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117, 3118-25.
- López, N. J., Quintero, A., Casanova, P. A. & Martínez, B. 2014. Routine prophylaxes every 3 months improves chronic periodontitis status in type 2 diabetes. *J Periodontol*, 85, e232-40.
- Llodra Calvo, J. C. 2010. Encuesta de Salud Oral en España 2010. Enero 2012 ed. España: RCOE.
- Martín, B. J. & Anderson, T. J. 2009. Risk prediction in cardiovascular disease: the prognostic significance of endothelial dysfunction. *Can J Cardiol*, 25 Suppl A, 15a-20a.
- Matsuzawa, Y., Kwon, T. G., Lennon, R. J., Lerman, L. O. & Lerman, A. 2015. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*, 4.
- Mattila, K. J., Nieminen, M. S., Valtonen, V. V., Rasi, V. P., Kesaniemi, Y. A., Syrjala, S. L., Jungell, P. S., Isoluoma, M., Hietaniemi, K. & Jokinen, M. J. 1989. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Bmj*, 298, 779-81.
- Meurman, J. H., Sanz, M. & Janket, S. J. 2004. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 403-13.
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., Fowkes, F. G. & Rutherford, R. B. 2007. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol*, 26, 81-157.
- 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.

- Offenbacher S, W. R., Champagne C. 1996. *Oral biofilms in health and disease*, Cardiff.
- Page, R. C. & Korman, K. S. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
- 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, 277-90.
- Pathirana, R. D., O'brien-Simpson, N. M. & Reynolds, E. C. 2010. Host immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens. *Periodontol 2000*, 52, 218-37.
- Piconi, S., Trabattoni, D., Luraghi, C., Perilli, E., Borelli, M., Pacei, M., Rizzardini, G., Lattuada, A., Bray, D. H., Catalano, M., Sparaco, A. & Clerici, M. 2009. Treatment of periodontal disease results in improvements in endothelial dysfunction and reduction of the carotid intima-media thickness. *Faseb j*, 23, 1196-204.
- Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. 2011. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 60-84.
- Quirynen, M., Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Dekeyser, C., Papaianou, W. & Eysen, H. 1995. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res*, 74, 1459-67.
- Ras, R. T., Streppel, M. T., Draijer, R. & Zock, P. L. 2013. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol*, 168, 344-51.
- Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Rolda, S. & Progulske-Fox, A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol*, 84, S30-50.
- Rivera, M. F., Lee, J. Y., Aneja, M., Goswami, V., Liu, L., Velsko, I. M., Chukkapalli, S. S., Bhattacharyya, I., Chen, H., Lucas, A. R. & Kesavalu, L. N. 2013. Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(null) mice. *PLoS One*, 8, e57178.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- Salvi, G. E., Carollo-Bittel, B. & Lang, N. P. 2008. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*, 35, 398-409.

- Sanz, I., Alonso, B., Carasol, M., Herrera, D. & Sanz, M. 2012. Nonsurgical treatment of periodontitis. *J Evid Based Dent Pract*, 12, 76-86.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Giacaman, R., Herrera, D., Herzberg, M. C., Kononen, 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 Suppl 18, S5-s11.
- Sanz, M. & Kornman, K. 2013. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S164-9.
- Sanz, M. & Teughels, W. 2008. Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 35, 3-7.
- Sanz, M., Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., DelleMijn-Kippuw, N., Simon, R. & Winkel, E. 2000. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci*, 108, 383-92.
- Schenkein, H. A. & Loos, B. G. 2013. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Periodontol*, 84, S51-69.
- Seinost, G., Wimmer, G., Skerget, M., Thaller, E., Brodmann, M., Gasser, R., Bratschko, R. O. & Pilger, E. 2005. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *Am Heart J*, 149, 1050-4.
- Skilton, M. R., Maple-Brown, L. J., Kapellas, K., Celermajer, D. S., Bartold, M., Brown, A., O'dea, K., Slade, G. D. & Jamieson, L. M. 2011. The effect of a periodontal intervention on cardiovascular risk markers in Indigenous Australians with periodontal disease: the PerioCardio study. *BMC Public Health*, 11, 729.
- Slocum, C., Kramer, C. & Genco, C. A. 2016. Immune dysregulation mediated by the oral microbiome: potential link to chronic inflammation and atherosclerosis. *J Intern Med*, 280, 114-28.
- Streblov, D. N., Soderberg-Naucler, C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y. & Nelson, J. A. 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 99, 511-20.

- Tatakis, D. N. & Kumar, P. S. 2005. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, 49, 491-516, v.
- Taubman, M. A., Kawai, T. & Han, X. 2007. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol*, 34, 367-9.
- Teeuw, W. J., Slot, D. E., Susanto, H., Gerdes, V. E., Abbas, F., D'aiuto, F., Kastelein, J. J. & Loos, B. G. 2014. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 41, 70-9.
- Tomas, I., Diz, P., Tobias, A., Scully, C. & Donos, N. 2012. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 39, 213-28.
- Tonetti, M. S. 2009. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*, 36 Suppl 10, 15-9.
- Tonetti, M. S., D'aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., Suvan, J., Hingorani, A. D., Vallance, P. & Deanfield, J. 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*, 356, 911-20.
- Tonetti, M. S. & Van Dyke, T. E. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, S24-9.
- Toregeani, J. F., Nassar, C. A., Nassar, P. O., Toregeani, K. M., Gonzatto, G. K., Vendrame, R., Castilhos, J. S., Rotta, L. S., Reinheimer, A. C., Longoni, A. & Barcella, M. W. 2016. Evaluation of periodontitis treatment effects on carotid intima-media thickness and expression of laboratory markers related to atherosclerosis. *Gen Dent*, 64, 55-62.
- Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van Der Velden, U. & Van Der Weijden, F. 2012. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 39, 1042-55.
- Vidal, F., Figueredo, C. M., Cordovil, I. & Fischer, R. G. 2009. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol*, 80, 786-91.
- Wang, Z. & Hoy, W. E. 2010. C-reactive protein: an independent predictor of cardiovascular disease in Aboriginal Australians. *Aust N Z J Public Health*, 34 Suppl 1, S25-9.
- Weber, C. & Noels, H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17, 1410-22.

- Wilson, P. W., D'agostino, R. B., Levy, D., Belanger, A. M., Silbershatz, H. & Kannel, W. B. 1998. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 97, 1837-47.
- Yu, Y. H., Chasman, D. I., Buring, J. E., Rose, L. & Ridker, P. M. 2015. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 42, 21-8.
- Zeng, X. T., Leng, W. D., Lam, Y. Y., Yan, B. P., Wei, X. M., Weng, H. & Kwong, J. S. 2016. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. *Int J Cardiol*, 203, 1044-51.
- Zhang, T., Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Du, Y., Oguchi, S. & Yamamoto, M. 2010. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59, 143-51.