

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES ODONTOLÓGICAS



**IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL BÁSICO A NIVEL
MICROBIOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR**

Alejandro Abuelo Alonzo
Tutora: Bettina Alonso Álvarez

Madrid, septiembre de 2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

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

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos: BETTINA MARÍA ALONSO ÁLVAREZ

del alumno/a

Nombre y apellidos: ALEJANDRO ABUELO ALONZO

encuadrado en la línea de investigación

EFICACIA DE INTERVENCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE GINGIVITIS, PERIODONTITIS Y ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL BÁSICO A NIVEL MICROBIOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En MADRID, a 4 de SEPTIEMBRE de 2019.

Fdo: el profesor/a

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

MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

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

CENTRO: FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESTUDIANTE DE MÁSTER: ALEJANDRO ABUELO ALONSO

TUTOR/ES DEL TFM: BETTINA MARÍA ALONSO ÁLVAREZ

TÍTULO DEL TFM: "IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL BÁSICO
A NIVEL MICROBIOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON LA
ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR"

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

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

2. Colaboración mutua

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

3. Normativa

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

4. Obligaciones del estudiante de Máster

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

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

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

6. Buenas prácticas

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

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

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

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

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

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

8. Confidencialidad

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

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

9. Propiedad intelectual e industrial

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

10. Periodo de Vigencia

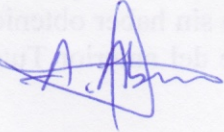

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

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

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

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

Firmado en Madrid, a 4 de SEPTIEMBRE de 2019

<p>El estudiante de Máster</p> <p style="text-align: center;">ALEJANDRO ABUELLO ALONSO</p> <p>Fdo.: </p>	<p>El Tutor/es</p> <p style="text-align: center;">BETTINA ALONSO ALVAREZ</p> <p>Fdo.: </p>
---	--

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. ALEJANDRO ABUELO ALONZO
con NIF 79064021-A, estudiante de Máster en la Facultad de
ODONTOLÓGICA de la Universidad Complutense de Madrid en el
curso 2018 -2019, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado
"IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL BÁSICO A NIVEL
MICROBIOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR"
y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

BETTINA MARÍA ALONSO ALVAREZ

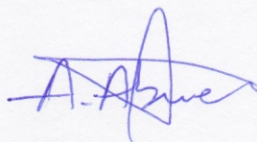
DECLARO QUE:

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

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

En Madrid, a 4 de SEPTIEMBRE de 2019

Fdo.:



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

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Enfermedades periodontales	2
a) Etiopatogenia.....	3
b) Tratamiento periodontal.....	4
1.2. Enfermedades cardiovasculares	5
a) Etiopatogenia.....	6
1.3. Asociación entre enfermedades periodontales y cardiovasculares	7
a) Plausibilidad biológica. Bacteriemia	8
b) Evidencia epidemiológica.....	10
i. Estudios preclínicos in vivo.....	11
ii. Estudios de intervención.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1. Diseño del estudio.....	15
5.2. Selección de la Población.....	15
5.3. Selección de la muestra.....	16
5.4. Cálculo del tamaño muestral.....	16
5.5. Aleatorización.....	17
5.6. Ocultamiento de la asignación.....	17
5.7. Enmascaramiento.....	17
5.8. Intervención.....	17
5.9. Seguimiento.....	18
5.10. Protocolo de seguridad.....	18
5.11. Recogida de datos.....	18
5.12. Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son definidas como un conjunto de enfermedades de tipo infeccioso-inflamatorias, localizadas en la encía y en las estructuras de soporte del diente (ligamento periodontal y hueso alveolar), con un origen multifactorial que conduce a una destrucción progresiva del periodonto.

Según la reciente **clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias** del *World Workshop* de 2018 podemos dividir las enfermedades periodontales en enfermedades/condiciones gingivales y en periodontitis. En este Workshop se unificaron las formas previamente denominadas periodontitis crónica y agresiva en un único grupo denominado “periodontitis”. Esta nueva clasificación está basada en la caracterización en función de estadios y grados que se pueden adaptar en función de la aparición de nueva evidencia. De forma general, existen cuatro **estadios** (I, II, III, IV) basados en la severidad y complejidad de manejo y tres **grados** (A, B, C) basados en la evidencia o riesgo de progresión rápida y posible respuesta al tratamiento (Caton *et al.* 2018).

Según la última **encuesta de Salud Oral** del año 2015 entre el 80-89% de la población española adulta (mayor de 35 años) presenta algún problema periodontal (Bravo Pérez M. *et al.* 2015). Carasol y colaboradores evaluaron la situación periodontal en la población trabajadora española y concluyeron que el 21,4% de ellos, presenta bolsas periodontales de más de cuatro milímetros, siendo el 50% mayor de 55 años. (Carasol *et al.* 2016).

A nivel mundial, la periodontitis avanzada se considera la sexta condición más frecuente, que afecta 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).

Por todo ello, se considera que la periodontitis es un problema relevante de salud pública, debido a su alta prevalencia, y al hecho de reducir la función masticatoria, alterar la estética, causar pérdidas dentarias y discapacidad; llegando incluso a ser una posible fuente de desigualdad social. Además de tener un impacto importante en los costes derivados de la patología bucodental y ser una enfermedad crónica con un impacto posible sobre la salud general (Baehni and Tonetti, 2010).

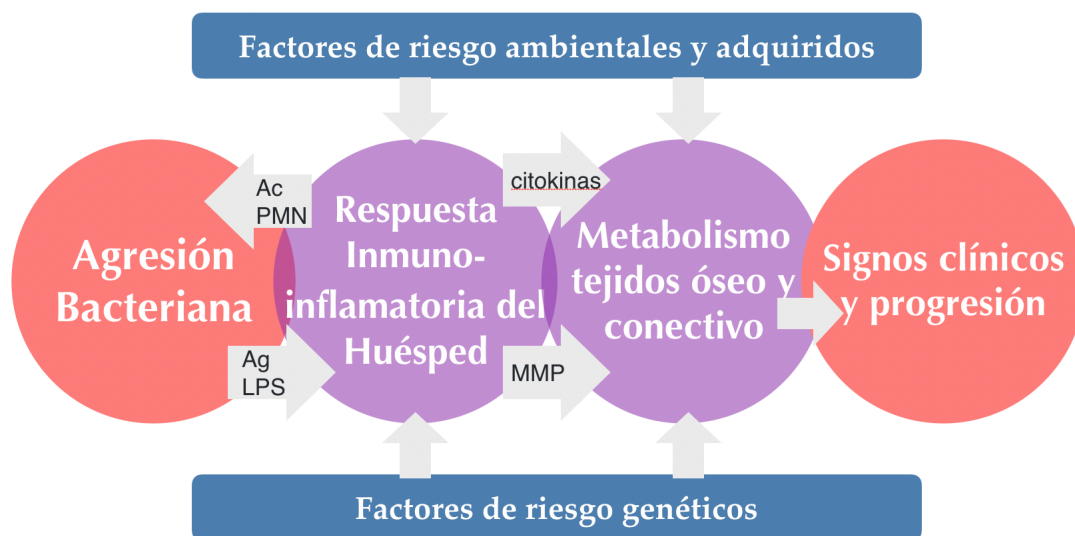
a) Etiopatogenia de las enfermedades periodontales

Las bacterias específicas en forma de **biofilm subgingival**, tienen un importante papel en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis, como factor etiológico primario, participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar, a través de un mecanismo inmunopatogénico. (Page *et al.* 1997). Sin embargo, el proceso es **multifactorial** y en él influyen también factores de riesgo genéticos y adquiridos, con un importante papel del sistema inmune del huésped y la reacción inflamatoria desencadenada. La microflora responsable de estas enfermedades es compleja, debido a que se han detectado más de 700 especies bacterianas diferentes en los biofilms orales. Clásicamente, los estudios clínicos y microbiológicos han definido patógenos clave, con clara importancia etiológica en la iniciación y progresión de la periodontitis (AAP 1996, Haffajee and Socransky 1994, Herrera *et al.* 2008) y se ha demostrado que la presencia de ciertas bacterias o asociaciones bacterianas son un factor de riesgo para futura pérdida de inserción periodontal. Entre estas especies bacterianas se encuentran *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Ambas disponen de un amplio arsenal de factores de virulencia, inducen una respuesta inmune humoral en el paciente, se han asociado a infecciones extraorales por translocación y pueden transmitirse entre miembros de una misma familia (Henderson *et al.* 2010, Pathirana *et al.* 2010).

Estudios previos han demostrado, tanto con técnicas de cultivo (Sanz *et al.* 2000) como con técnicas moleculares (Lau *et al.* 2004), que la frecuencia de detección de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis es especialmente elevada en España (superior al 60% de los pacientes con periodontitis). Por otro lado, *A. actinomycetemcomitans*, aunque con una menor prevalencia en la población española (Sanz *et al.* 2000), presenta un elevado potencial patógeno debido a sus factores de virulencia, especialmente, la producción de leucotoxina. (Claesson *et al.* 2011, Haubek *et al.* 2008).

Las bacterias periodontopatógenas que colonizan el biofilm subgingival se enfrentan a mecanismos tanto innatos como adquiridos del sistema inmune del huésped. Esta respuesta del huésped y los factores de virulencia de las bacterias son los principales determinantes de la destrucción de tejidos periodontales (Pathirana *et al.* 2010, Kornman *et al.* 2008).

Las células del sistema inmune producen grandes cantidades de mediadores inflamatorios como son las citoquinas (interleuquinas 1, 6, 8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)), prostaglandinas (PG-E2) y metaloproteinasas (MMP) responsables de la destrucción del tejido blando y duro. Esta interacción entre la infección producida por las bacterias y el sistema inmune está influenciada por factores genéticos y adquiridos, lo que confiere el carácter multifactorial a este grupo de enfermedades.



Modelo de patogenia multifactorial de las enfermedades periodontales. Ac: anticuerpos; Ag: antígenos bacterianos; LPS: lipopolisacárido; MMP: metaloproteinasas de la matriz; PMN: leucocitos polimorfonucleares, (Adaptado de Kornman et al. (Kornman, 2008).

Este modelo multifactorial explica que la presencia de bacterias patógenas no induce automáticamente una respuesta del huésped igual en todos los pacientes. Existe un rango de respuestas y manifestaciones clínicas de la enfermedad que están en parte determinados por factores genéticos y ambientales que modifican la respuesta del huésped. Cada combinación de variaciones genéticas y factores ambientales definirá un modo de expresión (Kornman *et al.* 2008). Las variaciones genéticas pueden tener una influencia en el desarrollo y severidad de la enfermedad de hasta 30 al 60%. Esta importante influencia del genotipo en la susceptibilidad a la periodontitis se ha evaluado principalmente en estudios con gemelos (Michalowicz *et al.* 1991). Por otro lado, los factores ambientales y adquiridos, entre los que se incluyen el tabaco, alcohol, drogas, medicamentos y las enfermedades sistémicas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, ciertas enfermedades respiratorias, artritis reumatoide, obesidad y síndrome metabólico, así como alteraciones del embarazo (nacimiento prematuro o recién nacidos de bajo peso, están siendo estudiados para encontrar la posible asociación con las periodontitis y los mecanismos por los que se produciría (Kornman *et al.* 2008). Actualmente, en el último Workshop, como el tabaco y la diabetes han demostrado una clara asociación con la periodontitis, se tienen en consideración dentro de los criterios para la clasificación de estas patologías, como claros factores de riesgo de progresión (Tonetti *et al.* 2018).

b) Tratamiento Periodontal

El objetivo final del tratamiento periodontal es **preservar la dentición natural** eliminando el proceso infeccioso. Para ello, el tratamiento no quirúrgico consistente en la combinación del desbridamiento supra y subgingival, en conjunción con métodos de higiene oral es la terapia más efectiva para erradicar la infección periodontal y controlar la inflamación gingival, (Sanz and Teughels 2008), consiguiendo reducir las profundidades de sondaje y ganar inserción periodontal (Lang *et al.* 2008).

La modalidad tradicional de la terapia no quirúrgica consiste en la instrumentación subgingival (**raspado y alisado radicular (RAR)**) por cuadrantes o sextantes, dependiendo de la extensión y severidad de la enfermedad, en diversas sesiones. El RAR se realiza normalmente con curetas, instrumentos manuales diseñados específicamente para el tratamiento periodontal. No obstante, en los últimos años los instrumentos activados mediante tecnología sónica o ultrasónica han sido más empleados por las ventajas que confieren aumentando el rendimiento en la capacidad de eliminación de placa y cálculo (Sanz *et al.* 2012).

Además, se ha demostrado en diversas revisiones sistemáticas y ensayos clínicos que el uso coadyuvante de agentes químicos en la terapia periodontal básica es eficaz para el control de placa e inflamación, siendo la clorhexidina el agente más 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).

Por otro lado, se han propuesto otros protocolos como alternativa al tratamiento convencional de RAR por sesiones que disminuyen el número y el intervalo de tiempo entre sesiones, así como el tiempo empleado para la instrumentación, pudiendo incluir o no el uso de varios antimicrobianos.

Con el objetivo de prevenir la reinfección de localizaciones ya tratadas, por parte de las localizaciones no tratadas, Quirynen *et al.* (1995) propusieron realizar la instrumentación de las bolsas periodontales de la dentición completa en un intervalo de tiempo inferior a 24 horas (raspado de boca completa o *full-mouth* RAR). También consideraron el riesgo de reinfección por otros nichos orales como la lengua o amígdalas y por tanto incluyeron un régimen antimicrobiano con clorhexidina (desinfección de boca completa o *full-mouth disinfection protocol*).

2. Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son enfermedades del sistema circulatorio caracterizadas por un mecanismo subyacente común, la aterosclerosis. Las más importantes son la enfermedad cardíaca coronaria (**angina e infarto de miocardio**), la patología **cerebrovascular isquémica** y las **enfermedades vasculares periféricas** (Tonetti *et al.* 2013).

Son la principal causa de muerte en el mundo y la OMS ha estimado que el 31% de todas las muertes registradas en el mundo en 2012 fueron por esta causa. Por esta razón, existe un gran esfuerzo sanitario no solo por realizar un diagnóstico temprano que evite la muerte, sino por su prevención mediante la disminución de los factores de riesgo cardiovasculares (FRCV) que son modificables (tabaquismo, sedentarismo, obesidad, hipertensión arterial (HTA), hipercolesterolemia y diabetes mellitus).

La enfermedad coronaria isquémica engloba todas aquellas enfermedades secundarias a una isquemia miocárdica, es decir, a una ausencia del adecuado aporte de oxígeno al músculo cardíaco, casi siempre, como consecuencia de patología obstructiva en las arterias coronarias. La obstrucción puede ser parcial, pudiendo originar una angina de pecho; o total, en cuyo caso puede producirse un infarto de miocardio (De Teresa *et al.* 2003).

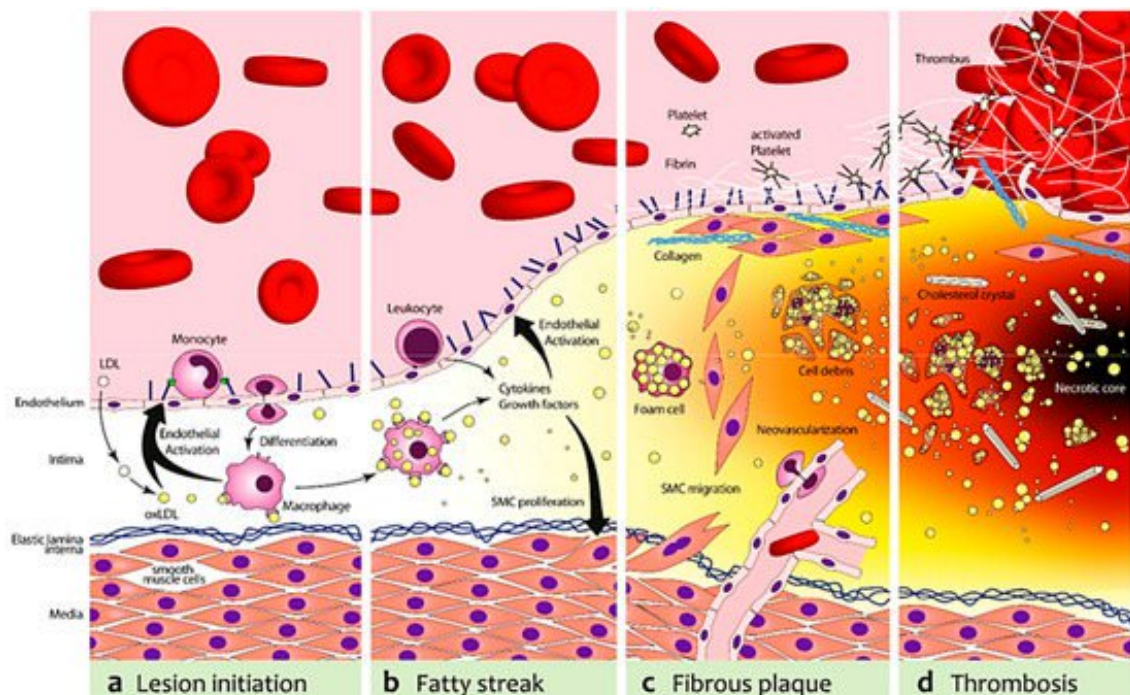
En la enfermedad vascular periférica (EVP) existe una obstrucción al flujo sanguíneo en las extremidades superiores o inferiores. La causa más frecuente es la enfermedad aterosclerótica, pero también puede deberse a trombosis, embolias, vasculitis, etc. (Meurman *et al.*, 2004). La EVP se correlaciona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

a) Etiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares

Aunque las ECV son enfermedades **multifactoriales**, su causa subyacente es la **ateroesclerosis**, proceso inflamatorio crónico de la pared arterial donde se produce una alteración de la renovación/reparación de la pared vascular conduciendo a la obturación del vaso y el consiguiente daño tisular por la falta de perfusión sanguínea. Sin embargo, actualmente, se ha demostrado que estas patologías no son debidas, exclusivamente, al depósito de lípidos en la pared de las arterias, sino que, además, existe una base inflamatoria muy importante (Braunwald *et al.* 1996).

La etiología inflamatoria de la aterosclerosis se explica porque los procesos de inflamación sistémica, caracterizados por niveles elevados de proteína C-reactiva (CRP), promueven, no sólo, el inicio de la lesión, sino también su progresión y el desarrollo de las complicaciones atero-trombóticas, responsables de cuadros clínicos cardiovasculares.

Inicialmente, se producen cambios en el endotelio, con aumento de la migración de monocitos al espacio subendotelial, facilitado por citoquinas y distintos factores quimiotácticos (proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)), junto con la expresión de moléculas de adhesión tanto intercelular (ICAM-1) como vascular (VCAM-1) que son expresados por la inflamación sistémica. En el endotelio, los monocitos se transforman en macrófagos y comienzan a fagocitar lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas formando las células espumosas y dando lugar a la placa aterosclerótica. Si se suman otros factores de riesgo (hipertensión, hipercolesterolemia, etc.) aumenta el acumulo de células espumosas y el crecimiento de la placa de ateroma, que infiltra las capas musculares del endotelio (íntima-media). El crecimiento de la placa conduce a la estenosis de la luz vascular. En fases avanzadas, el estímulo inflamatorio induce apoptosis de las células musculares lisas, así como secreción de metaloproteinasas (MMP) que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, lo que favorece la ruptura de la placa que pone en marcha el mecanismo de la coagulación con formación de un trombo que, en último término, produce la oclusión vascular.



Representación esquemática del proceso de formación, maduración y ruptura de placas de ateroma (Gargiulo S. et al. 2016)

3. Asociación entre enfermedades periodontales y cardiovasculares

En los últimos quince años un importante número de estudios epidemiológicos han investigado la posible asociación entre las enfermedades periodontales y las

cardiovasculares (Bouchard *et al.* 2010, Reyes *et al.* 2013), reforzando la hipótesis de que las periodontitis pueden conferir un riesgo independiente en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Debido a la alta prevalencia tanto de periodontitis como de enfermedades cardíacas, se ha generado un gran interés tanto en la comunidad científica odontológica como en la médica, en la búsqueda de una posible relación entre ambas entidades.

a) Plausibilidad biológica. Bacteriemia.

Numerosos estudios provenientes de varias disciplinas como la biología celular, epidemiología, ensayos clínicos y estudios de investigación animal consistentemente revelan que las lesiones ateroscleróticas conllevan un **componente inflamatorio**. Las interacciones celulares involucradas en la aterogénesis son similares a aquellas desarrolladas en enfermedades crónicas inflamatorias, y las lesiones ateroscleróticas representan una serie de respuestas celulares y moleculares altamente específicas que se pueden describir, en resumen, como una enfermedad inflamatoria (Ross *et al.* 1993, 1999).

Las enfermedades periodontales representan infecciones mixtas de los tejidos periodontales en las cuales, numerosas bacterias Gram-negativas, en especial anaerobias, tienen un papel fundamental (Haffajee and Socransky 1994). En estas enfermedades, la formación de una bolsa periodontal coincide con una marcada proliferación bacteriana, alcanzando niveles de 10^9 o 10^{10} células bacterianas por bolsa periodontal.

Las enfermedades periodontales pueden predisponer a la aparición de enfermedad vascular, 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).

Actualmente se han expuesto principalmente dos posibles vías de asociación por la cual bacterias periodontales pueden inducir o acelerar la aterosclerosis:

Vía directa:

El epitelio ulcerado de **la bolsa periodontal** proporciona una **vía de entrada** por la cual lipopolisacáridos (LPS), vesículas de la membrana bacteriana, fimbrias y otras estructuras antigénicas de origen bacteriano pueden desafiar el sistema inmune y provocar una respuesta inflamatoria local y sistémica (Ebersole y Taubman 1994), siendo considerado esto una vía directa de asociación.

Por otro lado, es importante remarcar que existen especies patógenas involucradas en infecciones periodontales que presentan propiedades invasoras (Meyer *et al.* 1991). 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* (67%) en placas de ateroma humanas extraídas de pacientes sometidos a endarterectomía (Figuero *et al.*, 2011). Este hecho se debe al proceso conocido como **bacteriemia**.

Bacteriemia

Se define como bacteriemia a la presencia de bacterias en sangre. Se conoce 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 cm², por lo que una rotura de esta barrera física puede dar lugar a una diseminación sistémica de estos microbios (Reyes *et al.*, 2013).

Otros estudios, también, han encontrado que *P. gingivalis* 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).

Es frecuente la aparición de bacteriemias tras tratamientos dentales como extracciones, raspado y alisado radicular, sondaje periodontal, remoción de suturas, tratamientos ortodóncicos, tratamientos de odontología restauradora y tratamientos de conductos no quirúrgicos. (Forner *et al.* 2006). La frecuencia de bacteriemias tras procedimientos dentales varía entre el 0-100%. Dicha variación es probable que se debe a la sensibilidad de los métodos de detección, ya que las bacteriemias están caracterizadas normalmente por bajas concentraciones de bacterias en sangre, así como por diferentes tratamientos dentales y posibles enfermedades. (Forner *et al.* 2006)

Las bacterias acceden al torrente sanguíneo inmediatamente tras el tratamiento y es común que cesen tras 30 minutos. En el caso específico de bacteriemias tras raspado y alisado radicular, estas oscilan entre el 13-80%, tras sondaje periodontal entre 20-43% y tras cirugía periodontal del 60% (Kinane *et al.* 2005, Crasta *et al.* 2009, Daly *et al.* 2001).

Además, bacteriemias transitorias pueden ocurrir de forma frecuente como resultado de actividades normales como el cepillado dental o en la masticación (Kinane *et al.* 2005), así como tras procedimientos terapéuticos invasivos. Diversas investigaciones proponen que estas bacteriemias producen un daño crónico a los vasos, contribuyendo

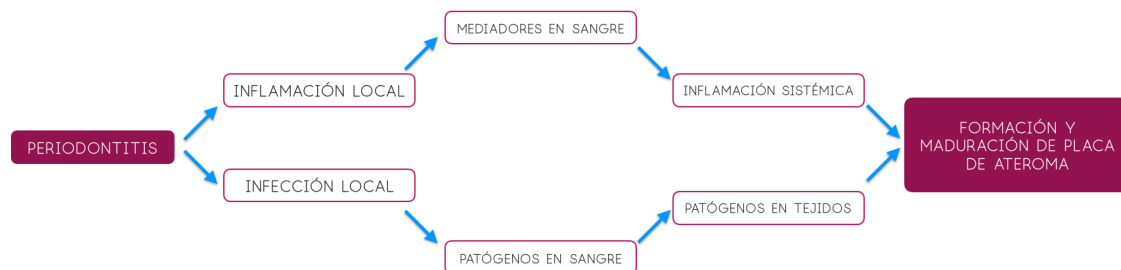
a la lesión e inflamación que desencadena el desarrollo de aterosclerosis (Rivera *et al.* 2013).

Aunque la mayoría de las bacteriemias son transitorias, es reconocido que pueden causar infecciones a distancia.

Vía indirecta:

Por otro lado, se ha demostrado una vía indirecta de asociación, en la cual mediadores proinflamatorios como las interleuquinas o metaloproteinasas, producidos localmente en los tejidos periodontales, son diseminados sistémicamente a través del torrente sanguíneo, alcanzando lugares a distancia del foco de infección inicial (Salvi *et al.* 1998).

Una vez producida la invasión bacteriana, tanto las propias bacterias, como sus productos producen una respuesta inmune celular, con la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias: IL 1, 6, 8, TNF α , PG-E2, y distintas MMPs, que influyen en la patogenia de la aterogénesis, situando a la enfermedad periodontal como factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular (Tonetti, 2009).



Esquema resumen de mecanismos de inducción de aterosclerosis por parte de patógenos periodontales

b) Evidencia epidemiológica

Las primeras evidencias de asociación entre ambas entidades datan de 1989 (Mattila *et al.* 1989). Desde entonces, numerosos **estudios observacionales**, principalmente transversales y de casos y controles, han demostrado una asociación positiva entre severidad de enfermedad periodontal y la presencia de enfermedad coronaria aterosclerótica. En los últimos años, se han publicado varias revisiones sistemáticas empleando meta-análisis que han agrupado y sintetizado la evidencia epidemiológica disponible que relaciona periodontitis y enfermedades cardiovasculares (Bahekar *et al.* 2007, Beck *et al.* 2005, Humphrey *et al.* 2008, Blaizot *et al.* 2009). Bahekar *et al.* (2007), en el meta-análisis de 5 estudios prospectivos (86.092 pacientes), encuentran que los individuos con periodontitis tienen 1.14 veces más riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular que los controles (riesgo relativo 1.14, IC 95% [1.074-1.213], $p < 0.001$).

Estudios de casos-controles (1.423 pacientes) mostraron también mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (OR 2.22, IC 95% [1.59-3.117], $p < 0.001$). Además, la prevalencia de enfermedad coronaria aterosclerótica en los estudios transversales (17.724 pacientes) fue significativamente mayor entre individuos con periodontitis (OR 1.59, IC 95% [1.329-1.907], $p < 0.001$). El más reciente de los meta-análisis, que incluyó 15 estudios observacionales, concluyó que la enfermedad periodontal está asociada a la aterosclerosis carotídea, con un odds ratio que varía de 1,02 a 5,60 (Zeng *et al.*, 2016).

El último consenso de la Federación Europea de Periodoncia sobre periodontitis y enfermedad cardiovascular aterosclerótica concluyó, en base a la evidencia disponible hasta el momento, que los sujetos con periodontitis presentan un riesgo significativamente mayor de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Este riesgo es especialmente mayor para patología cerebrovascular, y se encuentra aumentado en varones e individuos jóvenes. Además, se estableció que este riesgo añadido es independiente de otros factores de riesgo establecidos para enfermedad cardiovascular (Tonetti *et al.* 2013).

i. Estudios preclínicos in vivo

Los resultados de los estudios con **modelos experimentales en animales** confirman que la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* podría favorecer la formación de placas de ateroma y por ello, incrementar el riesgo de desarrollo y progresión de enfermedad cardiovascular (Chun *et al.* 2005, Hayashi *et al.* 2010). De este modo, la infección por *P. gingivalis* (Hayashi *et al.* 2010) o *A. actinomycetemcomitans* (Zhang *et al.* 2010) en ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) ha demostrado una aceleración del proceso de aterosclerosis en estos animales.

Además, 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 (Hayashi *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2010, Chukkapalli *et al.* 2017).

ii. Estudios de intervención

Los estudios de intervención, es decir, estudios que examinan los efectos del tratamiento periodontal con respecto a la enfermedad cardiovascular aterosclerótica pueden proporcionar información sobre el papel que desempeña la infección periodontal/inflamación como factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Los datos derivados de este tipo de estudios son de especial importancia desde el punto de vista de salud pública, ya que revelan si actuando sobre una

determinada exposición (por medios de terapia o prevención) puede dar como resultado beneficios, con respecto a la reducción de la incidencia de la enfermedad en cuestión.

Idealmente, esto se debe evaluar mediante **ensayos clínicos controlados y aleatorizados**. No obstante, en la actualidad no existen ensayos clínicos que hayan validado la hipótesis de que la periodontitis es un factor de riesgo independiente para el inicio o progresión de la enfermedad coronaria aterosclerótica. El diseño y la realización de estos estudios es particularmente complicado ya que requieren muestras muy amplias y periodos de seguimiento muy prolongados (debido a la larga evolución de una enfermedad cardiovascular aterosclerótica y la relativamente baja incidencia de eventos relacionados con ella). Además, existen evidentes problemas de tipo ético por la imposibilidad de dejar a pacientes con periodontitis sin tratamiento por periodos de tiempo prolongados.

Para vencer alguna de las complicaciones inherentes 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 mediante 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. Recientemente se ha recurrido al empleo como marcador de respuesta vascular la mejora en la **disfunción endotelial** (capacidad vasodilatadora reducida de arterias periféricas). **La vasodilatación endotelial (VDE)** medida en la arteria braquial evalúa, mediante el uso de ultrasonidos, los cambios en el diámetro de la arteria braquial tras insuflar flujo, tratándose de una medida fiable de la mejora de la función vascular. La VDE se presenta alterada 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). Estudios clínicos utilizando esta variable respuesta han demostrado que el tratamiento periodontal mejora significativamente la función vascular (Blum *et al.* 2007, Elter *et al.* 2006, Seinost *et al.* 2005, Tonetti *et al.* 2007). Por otra parte, también se ha empleado la medición del **espesor íntimo-medio carotídeo** como marcador de aterosclerosis. Las mediciones de este parámetro presentan una fuerte correlación con el estado de las arterias coronarias y cerebrales, y ha demostrado ser un buen predictor de eventos isquémicos cardiovasculares y cerebrales (Piconi *et al.*, 2009, Skilton *et al.*, 2011, Toregeani *et al.*, 2016)

Es especialmente relevante por su diseño y por su importancia el ensayo clínico publicado por Tonetti *et al.* (2007), en el que el grado de mejora de la función vascular se asoció significativamente con el grado de mejora de los parámetros periodontales, teniendo el grupo de tratamiento intensivo resultados significativamente mejores que

el grupo de tratamiento control. No obstante, este estudio no tiene en cuenta el riesgo cardiovascular previo de los pacientes incluidos; es lógico pensar que los sujetos que más se van a beneficiar del tratamiento son aquellos en la función cardiovascular está alterada previamente. Esto ha sido llevado a cabo por Offenbacher *et al.* 2009, aunque sin realizar mediciones de VDE. Por otro lado, 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.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la evidencia suficiente que asocia la periodontitis con enfermedades cardiovasculares y su mayor riesgo a sufrirlas o agravarlas y la presencia de dificultades a la hora de realizar estudios de intervención que permitan valorar los beneficios del tratamiento periodontal a nivel cardiovascular, se diseñó este ensayo clínico aleatorizado de 6 meses de duración, en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida y con periodontitis clasificada en estadios 3-4, en el que el grupo test recibió tratamiento periodontal intensivo dirigido a erradicar o disminuir los niveles de patógenos periodontales, consistente en 2 sesiones de raspado y alisado radicular y el grupo control recibió un tratamiento consistente en tartrectomía y profilaxis.

HIPÓTESIS DEL ESTUDIO GENERAL

En pacientes con periodontitis y enfermedad cardiovascular establecida, el tratamiento periodontal básico, consistente en raspado y alisado radicular, 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 de vasodilatación endotelial (VDE) medida en la arteria braquial.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

En pacientes con periodontitis y enfermedad cardiovascular establecida, el tratamiento periodontal básico, consistente en raspado y alisado radicular, dirigido hacia la reducción de los niveles de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* a nivel subgingival aumenta el riesgo de sufrir bacteriemias, pudiendo ser detectadas mediante la técnica de cultivo en sangre. Además, el tratamiento periodontal básico es capaz de mejorar la respuesta clínica y microbiológica periodontal de estos pacientes.

OBJETIVOS

General del estudio

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.

Específico de este TFM

1. Detectar y cuantificar los niveles de bacterias periodontales que ingresan en el torrente sanguíneo durante el tratamiento periodontal básico en paciente con enfermedad cardiovascular preestablecida.
2. Confirmar que el tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular con anestesia) mejora los parámetros microbiológicos periodontales de los pacientes en comparación con el grupo control, durante todo el periodo de seguimiento (6meses).
3. Confirmar que el tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular con anestesia) mejora los parámetros clínicos periodontales de los pacientes en comparación con el grupo control, durante todo el periodo de seguimiento (6meses)

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

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

Selección de la Población

La población accesible a estudiar estuvo compuesta por pacientes procedentes del Servicio de Cardiología del Hospital Severo Ochoa de Leganés, que acudían de forma secuencial a la unidad de Rehabilitación Cardíaca, por padecer enfermedad cardiovascular establecida. Posteriormente, se realizó sobre estos pacientes una exploración periodontal completa, por parte de dos periodoncistas experimentados de la Facultad de Odontología de la UCM que se desplazaban a tal efecto al Hospital Severo Ochoa, y seleccionaron a aquellos pacientes que presentaban periodontitis crónica moderada/avanzada generalizada.

Selección de la muestra

Criterios de inclusión

- a) 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 $\geq 50\%$.
- b) Diagnóstico de periodontitis generalizada en estadios 3-4: 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).
- c) Presencia de al menos 3 dientes por cuadrante.

Criterios de exclusión

- a) Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal en el último año.
- b) Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.
- c) Fumadores de 10 o más cigarrillos al día.
- d) Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- e) Diabetes mellitus tipo I, o tipo II con valores de hemoglobina glicosilada > 7 .
- f) Enfermedades periodontales necrosantes.
- g) Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).
- h) 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 conseguir 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).

Para este trabajo fin de máster, se evaluarán los datos de una muestra representativa de pacientes que tenían todas sus visitas completas (6 pacientes)

Aleatorización

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

Ocultamiento de la Asignación

El método de ocultación de la asignación empleado fue a través de unos sobres opacos, que no permitían ver el contenido, sellados y secuencialmente numerados. Éstos fueron desvelados al operador en el momento de comenzar el tratamiento periodontal asignado.

Enmascaramiento

Se diseñó el estudio de forma que fuesen ciegos al tratamiento:

- Examinadores (variables periodontales y cardiovasculares): éstos fueron personas diferentes a los operadores, de forma que desconocieron el tratamiento recibido por los pacientes.
- Analista: aportando la información con los nombres de los grupos ocultos.
- Pacientes: no conocieron a qué grupo de estudio pertenecían

Intervención

Los procedimientos se realizaron en las clínicas del Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCM, por un operador experimentado.

Grupo test

Se les realizó un tratamiento periodontal básico consistente en dos sesiones de raspado y alisado radicular (RAR) con anestesia local (ultrasonido (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.

Grupo control

El tratamiento periodontal para el grupo control 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 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.

Seguimiento

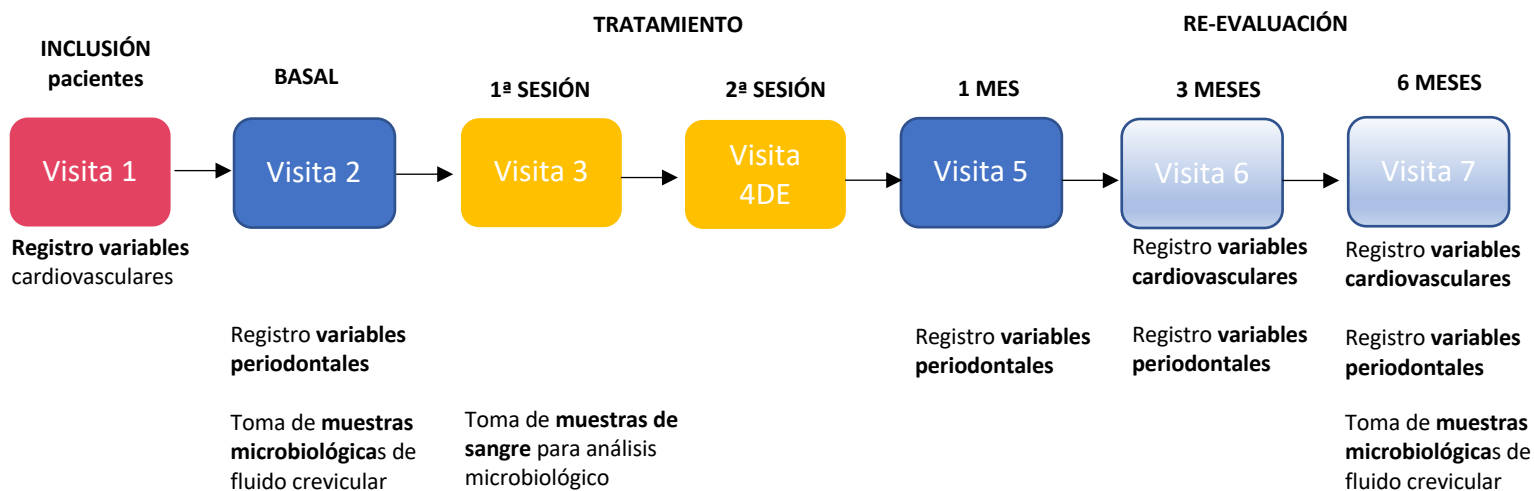
Ambos grupos recibieron terapia periodontal de mantenimiento cada 3 meses, una vez estabilizada la situación periodontal inicial.

Protocolo de seguridad

Aquellos pacientes en los que durante las visitas de seguimiento se observase una progresión de la enfermedad periodontal (pérdidas de inserción superiores a 2mm) serían retirados del estudio, recibiendo el tratamiento periodontal oportuno y sus datos serían considerados sólo hasta ese momento.

Recogida de datos

Todas las mediciones, salvo la historia médica inicial, se realizaron antes del tratamiento, al mes (variables periodontales únicamente), a los 3 y 6 meses después del tratamiento. La secuencia de visitas seguidas por los pacientes incluidos fue la siguiente:



- Hospital Severo Ochoa
- Facultad de Odontología UCM
- Sesiones de tratamiento en facultad de Odontología UCM
- Hospital Severo Ochoa y Facultad de Odontología UCM

1. Historia médica

Se obtuvo la historia médica completa de los pacientes antes del comienzo del tratamiento. Se recogieron datos relativos a sexo, edad, lipoproteínas de alta densidad (cHDL), colesterol total, presión arterial sistólica en reposo, tabaquismo, circunferencia abdominal, sedentarismo, postmenopausia, historia familiar de ECV prematura, factores psicosociales, triglicéridos, resistencia a la insulina, niveles de homocisteína. Igualmente, se registró la ingesta de medicación (tratamientos vasoactivos), enfermedad cardiovascular periférica o ACVA, e información relativa a los antecedentes de angor inestable o infarto (tratamiento recibido, colocación de stent o bypass, número de vasos con obstrucción $\geq 50\%$).

2. Datos periodontales

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

- a. **Profundidad de sondaje** en milímetros (distancia desde la base de la bolsa periodontal hasta el margen gingival).

- b. **Recesión** en milímetros (distancia desde el margen gingival hasta el límite amelocementario).
- c. **Nivel de inserción** en milímetros (se calculó automáticamente sumando recesión y profundidad de sondaje).
- d. **Índice de placa** (presente/ausente).
- e. **Sangrado al sondaje**, como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- f. **Índice de supuración** (presente/ausente).
- g. **Número de dientes presentes**.

3. Toma de muestras de fluido crevicular gingival (FCG)

Se seleccionó la localización más accesible con la mayor profundidad de sondaje y sangrado al sondaje de cada cuadrante (Mombelli *et al.* 1991).

Para su realización, se introducen dos puntas de papel estériles de forma consecutiva en la profundidad de la bolsa o del surco periodontal y se dejan en esa posición durante 10 segundos. Las puntas de papel de las cuatro localizaciones seleccionadas se introducen en un único vial con 2ml de fluido de transporte reducido (RTF) (toma de muestra agrupada) (Sanz *et al.* 2000) y se envían al laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid para su análisis.

4. Toma de muestras de sangre para análisis microbiológico (bacteriemia)

Se estudió la presencia y cantidad de bacterias periodontopatógenas (paso de bacterias periodontales a sangre) tras el tratamiento periodontal en ambos grupos. Todos los procedimientos fueron realizados en el quirófano de implantes de la Clínica de Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Para ello, se tomó una vía en la vena antecubital que permitiría la toma repetida de muestras de sangre periférica mediante técnica convencional (Vacutainer™, BectonDickinson®, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Loza Fernández *et al.* 2003).

El volumen total de sangre extraído en cada momento fue de 6ml, 2ml de los cuales se empleará para cultivo y 2ml para PCR. Los 2ml restantes se emplearon para el estudio de mediadores de inflamación en sangre. Se tomaron muestras antes de comenzar los procedimientos de manipulación oral y a los 10 minutos de tratamiento.

En el **grupo test**, se comenzó el raspado y alisado radicular por el cuadrante con mayor afectación periodontal. Seleccionando las 10 localizaciones de dicho cuadrante que presenten mayor profundidad de bolsa, se raspó con curetas cada

una de estas localizaciones durante 1 minuto. Posteriormente, 10 minutos tras haber tomado la muestra inicial, se tomó una segunda muestra de sangre. En los pacientes del **grupo control** se tomó igualmente una muestra inicial antes de comenzar el tratamiento, y se comenzó la profilaxis por el cuadrante con mayor afectación periodontal. La segunda muestra de sangre se tomó a los 10 minutos de tratamiento. Posteriormente se continuó con el procedimiento asignado de forma rutinaria.

Las muestras de sangre fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología para la detección e identificación de patógenos periodontales. Se realizó cultivo en placas específicas para la detección y recuento de periodontopatógenos (en medios Dentaid y Agar Sangre), así como PCR cuantitativa o a tiempo real.

5. Análisis microbiológico

El procesado de las muestras se realiza en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Las muestras de ADN son congeladas a -80°C y conservados hasta su posterior análisis mediante Real-Time PCR.

(a) Análisis mediante cultivo

Procesado de las muestras de FCG

Las puntas de papel se vortean durante 30 segundos y se preparan diluciones seriadas 1:10 en PBS (phosphate-buffered saline). De cada dilución de plaquean 100 µl en medio agar no selectivo (Oxoid nº 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos (*P. gingivalis*).

Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se plaquean en placas de medio Dentaid-1 (Alsina et al. 2001). Las placas de agar sangre son examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ at 37°C). Las placas Dentaid-1 necesitan entre 3 y 5 días de incubación a 37°C en aire con 5% de CO₂.

Los recuentos totales de anaerobios se realizan en las placas de agar. La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, además de cualquier otra especie que crezca de manera relevante en el medio, se realizan en las placas de agar no-selectivo. La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basa en la tinción Gram y en la morfología celular, aerotolerancia, producción de catalasa y se confirmará mediante el empleo de test bioquímicos estándar (RapIDTM ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.). Se recuentan las colonias en la placa con la dilución más adecuada, aquella con entre 30 y 300 colonias, y se calcula el

porcentaje que supone cada patógeno respecto a la flora total. Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizan en las placas de Dentaid-1. La identificación se basa en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), su reacción catalasa positiva y al uso de una serie de enzimas específicos (RapIDTM NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

Procesado de las muestras de sangre

Las muestras de sangre para cultivo son analizadas de forma inmediata tras su recogida.

Cada muestra recibe los siguientes procedimientos:

- 500 µl de sangre son plaqueadas directamente en placas de agar sangre no selectivas.
- 500 µl de sangre son plaqueadas directamente en placas Dentaid-1.
- 100 µl de sangre son plaqueados directamente en placas de agar sangre no selectivo cinco veces.
- 100 µl de sangre son plaqueados directamente en placas Dentaid-1 cinco veces.

7. Tratamiento final de muestras microbiológicas

Durante el periodo de seguimiento, el ADN extraído de las muestras microbiológicas (sangre y fluido gingival crevicular) es conservado en estado de congelación a -80°C. Una vez finalizado el periodo de seguimiento y realizados los exámenes oportunos, todas las muestras microbiológicas serán destruidas por esterilización en autoclave a 134°C y posteriormente retiradas por medio de un servicio de recogida de basuras selectivas.

Análisis estadístico

Variables respuesta:

- Primaria: Frecuencia de detección y prevalencia de bacterias en sangre.
- Secundarias: Nivel de inserción clínico periodontal, profundidad de sondaje, recesión, índice de placa, sangrado al sondaje, cantidad, frecuencia de detección y prevalencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en FCG.
- Otras: datos médicos, cardiovasculares.

Se compró la distribución de la muestra mediante **diagramas de caja y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk** (< 50 pacientes).

A nivel microbiológico, se calcularon el recuento total de bacterias en UFC/ml y además del recuento y proporción de los periodontopatógenos, se calcularon las frecuencias de

detección de las bacterias seleccionadas. Para mejorar la normalidad de la distribución de los datos microbiológicos se hizo la transformación logarítmica de los mismos.

La unidad de análisis fue el paciente y cada variable se presentó, en cada visita, como media, desviación estándar y con un 95% de intervalo de confianza.

Se compararon ambos grupos en la visita basal y los cambios entre la visita a los 6 meses y la inicial. Para ello se utilizó, para las **variables continuas**, el test t para muestras independientes (en caso de obtener una distribución normal) o el test de U-Mann Whitney (en caso de no normalidad). Para los **datos categóricos** se construyeron tablas de contingencia y se aplicó la prueba chi cuadrado y el estadístico de Fisher para el análisis intergrupo y para el análisis intragrupo se utilizó el test de McNemar.

El análisis de las variables clínicas en las diferentes visitas (basal, 1 mes, 3 meses, 6 meses) se compararon mediante el análisis de la varianza ANOVA de medidas repetidas mixto (con corrección de Bonferroni).

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

La selección de la muestra de pacientes se ha realizado en el periodo entre noviembre de 2017 y junio de 2018, incluyendo 6 pacientes, 3 perteneciendo al grupo test y 3 al grupo control.

Todos los pacientes han terminado el periodo de estudio, no habiendo ningún abandono.

Datos médicos

En la *tabla 1* vienen recogidos los datos referentes a las **variables cualitativas**. Cabe destacar que de los 6 pacientes únicamente uno fumaba actualmente (6 cigarrillos al día) y sólo hay una mujer (grupo control). Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre los grupos con respecto a las variables estudiadas.

Variable		Grupo control		Grupo Test		Valor de p
		n	%	n	%	
Sexo	H	2	66,7	3	100	1,00
	M	1	33,3	0	0,0	
Tabaco (>10 cg/día)	No	3	100	3	100	♣
	Si	0	0	0	0	
Alergias	No	2	66,6	2	66,7	1,00
	Si	1	33,3	1	33,3	
Resistencia a la insulina	No	2	66,7	3	100	1,00
	Si	1	33,3	0	0,0	
Sedentarismo	No	2	66,7	0	0,0	0,400
	Si	1	33,3	3	100	
Postmenopausia	No	2	66,7	3	100	1,00
	Si	1	33,3	0	0,0	
Historia Familiar de ECV	No	2	66,7	0	0,0	0,400
	Si	1	33,3	3	100	
Stent	No	1	33,3	1	33,3	1,00
	Si	2	66,7	2	66,7	

Variable	Grupo control		Grupo Test		Valor de p
	n		n		
Edad	3	54,5	3	57,8	0,746

Tabla 1: Datos médicos generales, variables cualitativas. H (Hombres), M (Mujeres), ECV (Enfermedad cardiovascular).

♣ No se calculará ningún estadístico porque Fumar > 10 cig/día es una constante.

En la tabla 2 se recogen los datos referentes a **factores de riesgo cardiovascular** al inicio del estudio. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Nombre de la variable	Valor grupo Test			Valor grupo Control			Diferencia de medias	Intervalo de confianza 95%		Valor de p
	n	Media	DE	n	Media	DE		Inf	Sup	
Años fumando	3	16,67	17,559	3	19,33	17,786	-2,667	-42,731	37,397	0,930
Colesterol total	3	143,67	20,033	3	163,00	49,112	-19,333	-104,357	65,690	0,187
cHDL (mg/dL)	3	35,00	8,888	3	39,00	16,643	-4,000	-34,245	26,245	0,211
Triglicéridos	3	177,67	81,292	3	132,33	35,162	45,333	-127,181	217,847	0,157
Sistólica en reposo (mmHg)	3	123,33	35,162	3	129,67	13,503	-6,333	-46,333	33,666	0,360
Peso (Kg)	3	74,000	8,2055	3	102,033	32,7757	-28,033	-82,193	26,126	0,85
Altura (m)	3	1,6667	0,7234	3	1,7520	0,0916	-115,583	-276,57	45,404	0,18
Circunferencia abdominal	3	63,33	55,429	3	119,67	23,861	-56,333	-174,052	61,385	0,128
Nº vasos obstruidos	3	0,67	0,577	3	0,67	0,577	0,00	-1,309	1,309	1,00

Tabla 2: Datos médicos generales, variables cualitativas. cHDL (Colesterol de alta densidad), IMC (Índice de masa corporal), DE (Desviación estándar), Inf inferior), Sup (superior).

Datos de muestras de sangre

Con respecto a los resultados de las muestras de sangre, los análisis mediante cultivo realizados no revelaron la presencia de bacteriemia en ningún paciente; ni previo al tratamiento ni 10 minutos después de comenzar el tratamiento en ninguno de los medios empleados (Agar sangre y Dentaid).

Datos periodontales

La *tabla 3* refleja las **variables periodontales** en cada paciente medidas **al inicio, al mes, 3 meses y 6 meses del estudio**, pudiendo observarse la evolución de cada variable tras el tratamiento.

Variable	Test			Control			Diferencia de medias	Intervalo de confianza 95%		Valor de la p	
	N	Media	DE	N	Media	DE		Inf	Sup		
NI	Basal	3	3,924	0,396	3	4,639	0,396	-0,715	-0,841	2,271	0,271
	1 m	3	3,713	0,498	3	4,403	0,498	-0,690	-2,645	1,266	0,383
	3 m	3	3,527	0,486	3	4,095	0,486	-0,568	-2,476	1,341	0,455
	6 m	3	3,201	0,427	3	4,005	0,427	-0,805	-0,872	2,481	0,254
PS	Basal	3	3,599	0,155	3	4,011	0,155	-0,412	-1,020	0,196	0,133
	1 m	3	2,683	0,275	3	3,271	0,275	-0,588	-1,669	0,493	0,206
	3 m	3	2,791	0,262	3	3,327	0,262	-0,536	-1,567	0,294	0,222
	6 m	3	2,674	0,163	3	3,233	0,163	-0,559	-1,198	0,080	0,072
Sang	Basal	3	0,444	0,047	3	0,758	0,047	-0,314	-0,497	-0,132	0,009
	1 m	3	0,309	0,122	3	0,584	0,122	-0,275	-0,756	0,206	0,187
	3 m	3	0,302	0,092	3	0,591	0,092	-0,289	-0,648	0,071	0,090
	6 m	3	0,281	0,129	3	0,507	0,129	-0,226	-0,734	0,282	0,284
Sup	Basal	3	0,002	0,011	3	0,015	0,011	-0,013	-0,057	0,030	0,442
	1 m	3	0,015	0,012	3	0,014	0,012	0,001	-0,046	0,049	0,937
	3 m	3	0,004	0,004	3	0,005	0,004	0,000	-0,015	0,014	0,942
	6 m	3	0,000	0,002	3	0,014	0,002	-0,014	-0,024	-0,005	0,014
IP	Basal	3	0,494	0,141	3	0,771	0,141	-0,278	-0,830	0,275	0,235
	1 m	3	0,216	0,126	3	0,470	0,126	-0,254	-0,748	0,241	0,227
	3 m	3	0,195	0,047	3	0,554	0,047	-0,359	-0,545	-0,173	0,006
	6 m	3	0,344	0,087	3	0,511	0,087	-0,167	-0,509	0,176	0,248
Rec	Basal	3	0,440	0,257	3	0,627	0,257	-0,187	-1,198	0,824	0,634
	1 m	3	1,018	0,233	3	1,170	0,233	-0,152	-1,067	0,762	0,668
	3 m	3	0,737	0,290	3	0,763	0,290	-0,027	-1,166	1,113	0,951
	6 m	3	0,549	0,354	3	0,856	0,354	-0,307	-1,696	1,081	0,572

Tabla 3: Parámetros clínicos periodontales; Pre- y Post-tratamiento. NI (Nivel de inserción clínica), PS (Profundidad de sondaje), Sang (Sangrado al sondaje), Sup (Supuración), IP (Índice de placa), Rec (recesión).

Todas las variables clínicas (nivel de inserción clínica, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, supuración y el índice de placa) se han reducido en ambos grupos, respecto a sus valores iniciales; salvo la recesión que tiende a aumentar después de la intervención correspondiente. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, para ninguna variable, salvo el índice de placa a los 3 meses (p= 0,006) y la supuración a los 6 meses (p=0,014).

En las tablas 4 a tabla 9 se detallan los datos de las **variables periodontales**, siendo evaluados de forma individual y haciendo análisis intragrupo (analizando el **factor tiempo**), intergrupo (analizando el **factor grupo de tratamiento**) y la **interacción o el efecto del grupo y tiempo**.

Comparación	1ª Comparación	2ª Comparación	N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza 95%		Valor de la p
							Inf	Sup	
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	4,281	0,280	0,223*	-0,535	0,981	1,000
	1 m		6	4,058	0,352	0,247†	-0,479	0,973	1,000
	3 m		6	3,811	0,344	0,208‡	-0,795	0,378	0,958
	6 m		6	3,603	0,302	0,678‡	0,017	0,847	0,046
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	3,591	0,439	0,694¥	-1,028	2,417	0,326
		Control	3	4,286	0,439				
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	3,924	0,396	0,715¥	-0,841	2,271	0,271
		Control	3	4,639	0,396				
	1 m	Test	3	3,713	0,498	0,690¥	-1,266	2,645	0,383
		Control	3	4,403	0,498				
	3 m	Test	3	3,527	0,486	0,569¥	-1,341	2,476	0,455
		Control	3	4,095	0,486				
	6 m	Test	3	3,201	0,427	0,805¥	-0,872	2,481	0,254
		Control	3	4,005	0,427				
N: tamaño muestral DE: desviación estándar		Basal	3	3,924	0,396	0,210*	-0,862	1,282	1,000
		1 m	3	3,713	0,498	0,186†	-0,840	1,212	1,000
		3 m	3	3,527	0,486	0,327‡	-0,502	1,156	0,770
		6 m	3	3,201	0,427	0,723‡	-0,213	1,658	0,120

Control	Basal	3	4,639	0,396	0,235*	-0,837	1,308	1,000
	1 m	3	4,403	0,498	0,308†	-0,718	1,334	1,000
	3 m	3	4,095	0,486	0,90 [¤]	-0,739	0,919	1,000
	6 m	3	4,005	0,427	0,633‡	-0,302	1,569	0,182

Tabla 4: Nivel de inserción periodontal. ANOVA de medidas repetidas para la pérdida de inserción, contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

En estos resultados, podemos observar analizando todos los pacientes agrupados por visitas (comparación tiempo -intragrupo-), que en el **nivel de inserción periodontal** (tabla 4) se produce una reducción estadísticamente significativa en la diferencia entre la visita a los 6 meses con respecto a la visita basal ($p=0,046$). No se observan diferencias cuando se comparan de forma global a los grupos (comparación de los grupos -intergrupo-), ni cuando se realiza la interacción tiempo con tipo de tratamiento.

Comparación	1ª Comparación	2ª Comparación	N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza		Valor de la p
							Inf	Sup	
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	3,805	0,109	0,828*	0,314	1,343	0,009
	1 m		6	2,977	0,195	-0,828†	-0,588	0,424	1,000
	3 m		6	3,059	0,186	0,105 [¤]	-0,335	0,546	1,000
	6 m		6	2,953	0,115	0,8852‡	0,535	1,169	0,001
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	3,591	0,439	0,694¥	-1,028	2,417	0,326
		Control	3	4,286	0,439				
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	3,599	0,155	0,412¥	-1,020	0,196	0,133
		Control	3	4,011	0,155				
	1 m	Test	3	2,683	0,275	0,588¥	-0,493	1,669	0,206
		Control	3	3,271	0,275				
	3 m	Test	3	2,791	0,262	0,536¥	-0,494	1,567	0,222
		Control	3	3,327	0,262				
	6 m	Test	3	2,674	0,163	0,559¥	-0,080	1,198	0,072
		Control	3	3,233	0,163				
N: tamaño muestral DE: desviación estándar * Basal vs 1 mes. † 1mes vs 3 meses ¤ 3meses vs 6 meses ‡ Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	3,599	0,155	0,916*	0,188	1,644	0,022
		1 m	3	2,683	0,275	-0,108†	-0,823	0,608	1,000
		3 m	3	2,791	0,262	0,117 [¤]	-0,506	0,739	1,000
		6 m	3	2,674	0,163	-0,926‡	-1,375	-0,477	0,003
	Control	Basal	3	4,011	0,155	0,740*	0,012	1,468	0,047

1 m	3	3,271	0,275	-0,056†	-0,771	0,659	1,000
3 m	3	3,327	0,262	0,094 [¤]	-0,529	0,716	1,000
6 m	3	3,233	0,163	-0,778‡	-1,227	-0,329	0,007

Tabla 5: Profundidad de sondaje. ANOVA de medidas repetidas para la profundidad de sondaje. contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

Se observa una reducción en la **profundidad de sondaje** (tabla 5), estadísticamente significativa entre basal y 1 mes para el grupo test ($p = 0,022$) y para el grupo control ($p=0,047$); y entre basal y los 6 meses para el grupo test ($p= 0,003$) y para el control ($p=0,007$). Teniendo una media final el grupo test de 2,674 y el grupo control de 3, 233, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las visitas ($p>0,05$).

Comparación	1ª Comparación		N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza		Valor de la p
	2ª Comparación						Inf	Sup	
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	0,601	0,033	0,155*	-0,298	0,607	1,000
	1 m		6	0,446	0,087	0,000†	-0,274	0,274	1,000
	3 m		6	0,447	0,65	0,053 [¤]	-0,046	0,152	0,364
	6 m		6	30,394	0,091	0,207‡	-0,260	0,675	0,585
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	0,334	0,082	0,276 [¥]	-0,045	0,597	0,075
		Control	3	0,610	0,082				
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,444	0,047	0,314 [¥]	0,132	0,497	0,009
		Control	3	0,758	0,047				
	1 m	Test	3	0,309	0,122	0,275 [¥]	-0,206	0,756	0,187
		Control	3	0,584	0,122				
	3 m	Test	3	0,302	0,092	0,289 [¥]	-0,71	0,648	0,090
		Control	3	0,591	0,092				
	6 m	Test	3	0,281	0,129	0,226 [¥]	-0,282	0,734	0,284
		Control	3	-0,281	0,129				
N: tamaño muestral DE: desviación estándar * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses ¤ 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,444	0,047	0,135*	-0,505	0,775	1,000
		1 m	3	0,309	0,122	0,007†	-0,381	0,394	1,000
		3 m	3	0,302	0,092	0,022 [¤]	-0,475	0,518	1,000
	Control	6 m	3	0,281	0,129	-0,163‡	-0,824	0,497	1,000
		Basal	3	0,758	0,047	0,174*	-0,466	0,814	1,000
		1 m	3	0,584	0,122	-0,007†	-0,395	0,381	1,000

3 m	3	0,591	0,092	0,084 ^α	-0,412	0,581	1,000
6 m	3	-0,281	0,129	-0,252 [‡]	-0,912	0,409	0,830

Tabla 6: Sangrado al sondaje. ANOVA de medidas repetidas para el sangrado al sondaje, contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

Con respecto al **sangrado** (tabla 6), se observa como las diferencias entre ambos grupos de tratamiento en basal son estadísticamente significativas ($p=0,009$), aunque en ambos grupos se produce una reducción en el sangrado al sondaje en todas las visitas, no existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo del periodo del estudio.

Comparación	1ª Comparación	2ª Comparación	N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza		Valor de la p																																																																																															
							Inf	Sup																																																																																																
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	0,009	0,008	-0,05*	-0,044	0,033	1,000																																																																																															
	1 m		6	0,014	0,008	0,010 [†]	-0,035	0,055	1,000																																																																																															
	3 m		6	0,004	0,003	-0,03 ^α	-0,009	0,004	0,697																																																																																															
	6 m		6	0,007	0,002	0,02 [‡]	-0,043	0,046	1,000																																																																																															
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	0,005	0,005	0,07 [¥]	-0,011	0,024	0,358																																																																																															
		Control	3	0,012	0,005					Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,002	0,011	0,013 [¥]	-0,030	0,57	0,442	Control	3	0,015	0,011	1 m	Test	3	0,015	0,012	-0,01 [¥]	-0,46	0,49	0,937	Control	3	0,014	0,012	3 m	Test	3	0,004	0,004	0,000 [¥]	-0,14	0,15	0,942	Control	3	0,005	0,004	6 m	Test	3	0,000	0,002	0,14 [¥]	0,05	0,24	0,014	Control	3	0,014	0,002	<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000		Test	3	0,015	0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α	-0,005	0,014	0,556		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000		Control	Basal	3	0,015
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,002	0,011	0,013 [¥]	-0,030	0,57	0,442																																																																																															
		Control	3	0,015	0,011						1 m	Test	3	0,015	0,012	-0,01 [¥]	-0,46	0,49	0,937	Control	3	0,014	0,012	3 m	Test	3	0,004	0,004	0,000 [¥]	-0,14	0,15	0,942	Control	3	0,005	0,004	6 m	Test	3	0,000	0,002	0,14 [¥]	0,05	0,24	0,014	Control	3	0,014	0,002	<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000		Test	3		0,015	0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α	-0,005	0,014	0,556		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000		Control	Basal	3	0,015	0,011	0,002*	-0,052	0,056	1,000							
	1 m	Test	3	0,015	0,012	-0,01 [¥]	-0,46	0,49	0,937																																																																																															
		Control	3	0,014	0,012						3 m	Test	3	0,004	0,004	0,000 [¥]	-0,14	0,15	0,942	Control	3	0,005	0,004	6 m	Test	3	0,000	0,002	0,14 [¥]	0,05	0,24	0,014	Control	3	0,014	0,002	<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000		Test	3		0,015	0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α		-0,005	0,014	0,556		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000		Control	Basal	3	0,015	0,011	0,002*	-0,052	0,056	1,000																			
	3 m	Test	3	0,004	0,004	0,000 [¥]	-0,14	0,15	0,942																																																																																															
		Control	3	0,005	0,004						6 m	Test	3	0,000	0,002	0,14 [¥]	0,05	0,24	0,014	Control	3	0,014	0,002	<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000		Test	3		0,015	0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α		-0,005	0,014	0,556		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000		Control	Basal	3	0,015	0,011	0,002*	-0,052	0,056	1,000																																
	6 m	Test	3	0,000	0,002	0,14 [¥]	0,05	0,24	0,014																																																																																															
		Control	3	0,014	0,002					<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000		Test	3	0,015		0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α	-0,005		0,014	0,556		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000		Control	Basal	3	0,015	0,011	0,002*	-0,052	0,056	1,000																																														
<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,002	0,011	-0,013*	-0,067	0,041	1,000																																																																																															
		Test	3	0,015	0,012	0,011 [†]	-0,053	0,074	1,000																																																																																															
		Test	3	0,004	0,004	0,004 ^α	-0,005	0,014	0,556																																																																																															
		Test	3	0,000	0,002	-0,002 [‡]	-0,065	0,014	1,000																																																																																															
		Control	Basal	3	0,015	0,011	0,002*	-0,052	0,056	1,000																																																																																														

1 m	3	0,014	0,012	0,009†	-0,55	0,73	1,000
3 m	3	0,005	0,004	-0,010 ^α	-0,019	0,000	0,044
6 m	3	0,014	0,002	-0,001‡	-0,064	0,061	1,000

Tabla 7: Supuración. ANOVA de medidas repetidas para supuración, contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

Existe una reducción en la supuración (tabla 7), estadísticamente significativa ($p=0,044$) entre la visita a los 3 meses versus 6 meses, solo en el grupo control. La diferencia en la presencia de supuración entre el grupo test y el grupo control en el periodo de 6 meses también es estadísticamente significativa ($p=0,014$).

Comparación	1ª Comparación	2ª Comparación	N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza		Valor de la p
							Inf	Sup	
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	0,633	0,100	0,290*	-0,441	1,021	0,761
	1 m		6	0,343	0,089	-0,032†	-0,591	0,528	1,000
	3 m		6	0,375	0,033	-0,053 ^α	-0,367	0,261	1,000
	6 m		6	0,428	0,062	-0,205‡	-0,578	0,169	0,338
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	0,312	0,065	0,264 [¥]	0,009	0,520	0,045
		Control	3	0,577	0,065				
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,494	0,141	0,278 [¥]	-0,275	0,830	0,235
		Control	3	0,771	0,141				
	1 m	Test	3	0,216	0,126	0,254 [¥]	-0,241	0,748	0,227
		Control	3	0,470	0,126				
	3 m	Test	3	0,195	0,047	0,359 [¥]	0,173	0,545	0,006
		Control	3	0,554	0,047				
6 m	Test	3	0,344	0,087	0,167 [¥]	-0,176	0,509	0,248	
	Control	3	0,511	0,087					
<i>N: tamaño muestral</i> <i>DE: desviación estándar</i> <i>* Basal vs 1 mes.</i> <i>† 1mes vs 3 meses</i> <i>α 3meses vs 6 meses</i> <i>‡ Basal vs 6 meses</i> <i>¥ Test vs control</i>		Basal	3	0,494	0,141	0,278*	-0,756	1,312	1,000
	Test	1 m	3	0,216	0,126	0,021†	-0,770	0,813	1,000
		3 m	3	0,195	0,047	-0,150 ^α	-0,594	0,295	1,000
		6 m	3	0,344	0,087	-0,149‡	-0,678	0,379	1,000
	Control	Basal	3	0,771	0,141	0,302*	-0,732	1,336	1,000
		1 m	3	0,470	0,126	-0,085†	-0,876	0,707	1,000
		3 m	3	0,554	0,047	0,043 ^α	-0,401	0,487	1,000
		6 m	3	0,511	0,087	-0,260‡	-0,789	0,268	0,450

Tabla 8: índice de placa. ANOVA de medidas repetidas para el índice de placa, contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

Existe una diferencia en el índice de placa (tabla 8) entre los grupos de tratamiento a nivel global independientemente de las visitas (media del grupo test de 0,312 y de grupo 0,577, $p=0,045$) y específicamente entre ambos grupos en el periodo de 3 meses ($p=0,006$).

Comparación	1ª Comparación	2ª Comparación	N	Media	DE	Diferencia de medias	Intervalo de confianza		Valor de la p																																																																																																																			
							Inf	Sup																																																																																																																				
Tiempo (intragrupo)	Basal		6	0,533	0,182	-0,560*	0,034	1,087	0,040																																																																																																																			
	1 m		6	1,094	0,165	0,344†	-0,292	0,980	0,352																																																																																																																			
	3 m		6	0,750	0,205	0,048 ^α	-0,517	0,613	1,000																																																																																																																			
	6 m		6	0,703	0,250	0,169‡	-0,275	0,613	0,830																																																																																																																			
Grupo de tratamiento (intergrupo)		Test	3	0,686	0,269	0,168 [¥]	-0,887	1,223	0,681																																																																																																																			
		Control	3	0,854	0,269					Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,440	0,257	0,187 [¥]	-0,824	1,198	0,634	Control	3	0,627	0,257	1 m	Test	3	1,018	0,233	0,152 [¥]	-0,762	1,067	0,668	Control	3	1,170	0,233	3 ms	Test	3	0,737	0,290	0,027 [¥]	-1,113	1,116	0,951	Control	3	0,763	0,290	6 m	Test	3	0,549	0,354	0,307 [¥]	-1,081	1,696	0,572	Control	3	0,856	0,354	N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118	1 m	3	1,018	0,233	0,281†	-0,619	1,181	1,000	3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611	0,987	1,000	6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000	Control	Basal	3	0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145	1 m	3	1,170	0,233	0,407†	-0,493	1,306	0,561	3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000	6 m	3	0,856
Tiempo y Tratamiento (interacción)	Basal	Test	3	0,440	0,257	0,187 [¥]	-0,824	1,198	0,634																																																																																																																			
		Control	3	0,627	0,257						1 m	Test	3	1,018	0,233	0,152 [¥]	-0,762	1,067	0,668	Control	3	1,170	0,233	3 ms	Test	3	0,737	0,290	0,027 [¥]	-1,113	1,116	0,951	Control	3	0,763	0,290	6 m	Test	3	0,549	0,354	0,307 [¥]	-1,081	1,696	0,572	Control	3	0,856	0,354	N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118	1 m	3	1,018			0,233	0,281†	-0,619	1,181	1,000	3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611	0,987	1,000	6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000	Control	Basal	3	0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145	1 m	3		1,170	0,233	0,407†	-0,493	1,306	0,561	3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000	6 m	3	0,856	0,354	0,229‡	-0,399	0,857	0,908					
	1 m	Test	3	1,018	0,233	0,152 [¥]	-0,762	1,067	0,668																																																																																																																			
		Control	3	1,170	0,233						3 ms	Test	3	0,737	0,290	0,027 [¥]	-1,113	1,116	0,951	Control	3	0,763	0,290	6 m	Test	3	0,549	0,354	0,307 [¥]	-1,081	1,696	0,572	Control	3	0,856	0,354	N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118	1 m	3	1,018			0,233	0,281†	-0,619	1,181	1,000	3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611		0,987	1,000	6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000	Control	Basal	3	0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145	1 m	3	1,170		0,233	0,407†	-0,493	1,306	0,561	3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000	6 m	3	0,856	0,354	0,229‡	-0,399	0,857	0,908																	
	3 ms	Test	3	0,737	0,290	0,027 [¥]	-1,113	1,116	0,951																																																																																																																			
		Control	3	0,763	0,290						6 m	Test	3	0,549	0,354	0,307 [¥]	-1,081	1,696	0,572	Control	3	0,856	0,354	N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118	1 m	3	1,018			0,233	0,281†	-0,619	1,181	1,000	3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611		0,987	1,000	6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000	Control	Basal		3	0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145	1 m	3	1,170		0,233	0,407†	-0,493	1,306	0,561	3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000	6 m	3	0,856	0,354	0,229‡	-0,399	0,857	0,908																													
	6 m	Test	3	0,549	0,354	0,307 [¥]	-1,081	1,696	0,572																																																																																																																			
		Control	3	0,856	0,354					N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118	1 m	3	1,018	0,233			0,281†	-0,619	1,181	1,000	3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611	0,987		1,000	6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000	Control	Basal	3		0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145	1 m	3	1,170	0,233		0,407†	-0,493	1,306	0,561	3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000	6 m	3	0,856	0,354	0,229‡	-0,399	0,857	0,908																																											
N: tamaño muestral DE: desviación estána * Basal vs 1 mes. †1mes vs 3 meses α 3meses vs 6 meses ‡Basal vs 6 meses ¥ Test vs control	Test	Basal	3	0,440	0,257	-0,578*	-1,323	0,167	0,118																																																																																																																			
		1 m	3	1,018	0,233	0,281†	-0,619	1,181	1,000																																																																																																																			
		3 m	3	0,737	0,290	0,188 ^α	-0,611	0,987	1,000																																																																																																																			
		6 m	3	0,549	0,354	0,109‡	-0,519	0,737	1,000																																																																																																																			
	Control	Basal	3	0,627	0,257	-0,543*	-1,288	0,202	0,145																																																																																																																			
		1 m	3	1,170	0,233	0,407†	-0,493	1,306	0,561																																																																																																																			
		3 m	3	0,763	0,290	-0,093 ^α	-0,892	0,706	1,000																																																																																																																			
		6 m	3	0,856	0,354	0,229‡	-0,399	0,857	0,908																																																																																																																			

Tabla 9: Recesión. ANOVA de medidas repetidas para la recesión, contrastes intra- e intergrupo y comparaciones múltiples por pares post hoc para las medias observadas (corrección de Bonferroni)

Por último, con respecto a las recesiones, en el análisis intragrupo, agrupando a todos los pacientes por visitas, se observa como hay un aumento de las recesiones estadísticamente significativo entre la visita basal y al 1 mes ($p=0,040$).

Datos microbiológicos

Las especies *A. actinomycescomitans*, *Capnocytophaga* o *Eubacterium* no fueron detectadas en ningún grupo de tratamiento a lo largo de la realización del estudio.

Las tablas 10, 11 y 12 exponen la frecuencia de detección de las bacterias seleccionadas para el análisis.

En la tabla 10 queda representado el recuento total e independiente de las bacterias analizadas, expresadas en log UFC/ml, al inicio y a los 6 meses, así como el cambio la visita a los 6 meses respecto a la visita basal.

	n	Grupo CONTROL Media (DE)	n	Grupo TEST Media (DE)	Diferencia de medias	Intervalo de confianza 95%		Valor p
						Inf	Sup	
Recuento total								
Inicial	3	7,466 (0,288)	3	7,321 (0,258)	-0,145	-0,766	0,475	0,550
6 meses	3	6,665 (0,839)	3	6,761 (0,367)	0,095	-1,374	1,556	0,865
Cambio	3	-0,801 (0,675)	3	-0,559 (0,352)	0,241	-0,979	1,1462	0,612
<i>P. gingivalis</i>								
Inicial	3	7,119 (0,199)	3	6,872 (0,468)	-0,247	-1,061	0,567	0,447
6 meses	3	4,357 (3,773)	3	5,876 (0,691)	1,519	-7,458	10,498	0,560
Cambio	3	-2,762 (3,694)	3	-0,995 (0,638)	1,767	-4,243	7,777	0,460
<i>P. intermedia</i>								
Inicial	3	5,602 (1,255)	3	5,151 (0,764)	-0,450	-2,806	1,905	0,624
6 meses	3	4,249 (0,923)	3	2,926 (2,542)	-1,323	-5,660	3,013	0,445
Cambio	3	-1,352 (1,228)	3	-2,225 (2,963)	-0,872	-6,014	4,269	0,662
<i>T. forsythia</i>								
Inicial	3	4,003 (2,504)	3	5,657 (0,500)	1,654	-7,049	10,358	0,499
6 meses	3	1,948 (3,374)	3	2,401 (0,923)	0,453	-6,894	7,800	0,872
Cambio	3	-2,054 (2,995)	3	-3,256 (3,074)	-1,201	-8,081	5,678	0,653
<i>P. micra</i>								
Inicial	3	0,00	3	1,984 (3,347)	1,984	-6,554	10,524	0,423
6 meses	3	1,756 (3,060)	3	3,159 (2,748)	1,392	-5,201	7,98	0,590
Cambio	3	1,176 (3,060)	3	1,174 (2,899)	-0,592	-7,358	6,173	0,820
<i>C. rectus</i>								
Inicial	3	0,00	3	1,666 (2,886)	1,666	-5,504	8,837	0,423

6 meses	3	0,00	3	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Cambio	3	0,00	3	-1,666 (2,886)	-1,666	-8,837	5,504	0,423
F. nucleatum								
Inicial	3	4,883 (0,272)	3	5,373 (0,634)	0,489	-0,617	1,597	0,287
6 meses	3	4,566 (1,026)	3	3,460 (3,002)	-1,106	-6,192	3,980	0,579
Cambio	3	-0,317 (1,295)	3	-1,913 (3,576)	-1,596	-7,692	4,500	0,508
E. corrodens								
Inicial	3	1,666 (2,886)	3	0,00	-1,666	-8,837	5,504	0,423
6 meses	3	0,00	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cambio	3	-1,666 (2,886)	3	0,00	1,666	-5,504	8,837	0,423

Tabla 10. Recuentos totales e independientes de las bacterias seleccionadas, expresados en media de log UFC/ml. Análisis intergrupo.

Con respecto al **recuento total de bacterias**, se observa como en ambos grupos hay una disminución de basal a los 6 meses, teniendo el grupo test una media inicial de 7,321 y siendo reducida a los 6 meses a 6,761, con un cambio de -0,559. El grupo control, por su parte, presentaba una media inicial de 7,466 siendo reducida a los 6 meses a 6,665, siendo el cambio de -0,801. No obstante, estas reducciones no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$).

Todas las **bacterias** presentan una reducción en el periodo de 6 meses en ambos grupos, a excepción de *P. micra* que aumenta en ambos grupos, no estando presente en el grupo control en la examinación inicial y con una media a los 6 meses de 1,756 y aumentando en el grupo test, presentado una media inicial de 1,984 y a los 6 meses de 3, 159.

	Grupo CONTROL (DE) (n=3)	Valor p	Grupo TEST (DE) (n=3)	Valor p	Diferencia de medias	Intervalo de confianza 95%		Valor p
						Inf	Sup	
P.gingivalis								
Inicial	45,586 (9,966)	0,060	39,513 (22,328)	0,496	-6,073	-44,644	32,496	0,685
6 meses	20,828 (25,558)	0,497	16,254 (11,519)	0,910	-4,574	-49,513	40,362	0,792
P.intermedia								
Inicial	4,534 (4,917)	0,265	4,534 (4,917)	0,782	0,796	5,395	-13,488	0,796
6 meses	2,965 (2,801)	0,48	1,351 (1,218)	0,539	-1,614	-6,510	3,282	0,412
T. forsythia								
Inicial	7,614 (7,560)	0,676	13,775 (20,650)	0,000	7,061	-28,19	42,31	0,608
6 meses	0,988 (1,712)	0,080	2,188 (2,520)	0,086	1,119	-5,076	7,475	0,624
P. micra								
Inicial	1,639 (2,839)	0,000	1,639 (2,839)	0,000	1,639	-5,414	8,692	0,374
6 meses	0,282 (0,489)	0,000	0,418 (0,393)	0,768	0,135	-0,870	1,142	0,727
F. nucleatum								
Inicial	3,844 (3,060)	0,825	3,789 (2,89)	0,535	-0,074	6,689	6,681	0,977
6 meses	1,877 (0,866)	0,402	2,668 (2,320)	0,179	0,791	-3,180	4,762	0,61

<i>E. corrodens</i>								
Inicial	0,173 (0,300)	0,00	0	-	-0,173	-0,655	0,308	0,374
6 meses	0	0	0	-	0	0	0	-

Tabla 11: Proporción de especies bacterianas expresadas en media (%).

En la tabla 11 observamos que no hay diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de las bacterias, en ninguno de los momentos de toma de muestras del estudio ($p > 0,05$). No obstante, se observa como la presencia de todas las bacterias disminuye comparando la examinación inicial y los 6 meses.

		Grupo Control		Grupo Test		Valor p
		n	%	n	%	
<i>P.gingivalis</i>						
V1	Si	3	100	3	100	-
	No	0	0	0	0	
V6	Si	2	66,7	3	100	1,000
	No	1	33,3	0	0	
<i>P.intermedia</i>						
V1	Si	3	100	3	100	-
	No	0	0	0	0	
V6	Si	3	100	2	66,7	1,000
	No	0	0	1	33,3	
<i>T. forsythia</i>						
V1	Si	2	66,7	3	100	1,000
	No	1	33,3	0	0	
V6	Si	1	33,3	2	66,7	1,000
	No	2	66,7	1	33,3	
<i>P. micra</i>						
V1	Si	0	0	1	33,3	1,000
	No	3	100	2	66,7	
V6	Si	1	33,3	2	66,7	1,000
	No	2	66,7	1	33,3	
<i>C. rectus</i>						
V1	Si	0	0	1	33,3	1,000
	No	3	100	2	66,7	
V6	Si	0	0	0	0	-
	No	3	100	3	100	
<i>F. nucleatum</i>						
V1	Si	3	100	3	100	-
	No	0	0	0	0	
V6	Si	3	100	2	66,7	1,000
	No	0	0	1	33,7	
	No	3	100	3	100	

<i>E. corrodens</i>						
V1	Si	1	33,3	0	0	1,000
	No	2	66,7	3	100	
V6	Si	0	0	0	0	-
	No	3	100	3	100	

Tabla 12: Número y porcentaje de pacientes positivos para las bacterias seleccionadas. Análisis intergrupo.

La *tabla 12* representa la prevalencia de bacterias detectadas. No se observan diferencias significativas en el número de pacientes positivos para los periodontopatógenos estudiados, entre grupos, en ningún momento del estudio ($p > 0,05$)

DISCUSIÓN

El presente trabajo fin de Máster evaluó la detección y cuantificación de niveles de bacterias periodontales que ingresan en el torrente sanguíneo durante el tratamiento periodontal básico, en pacientes con enfermedad cardíaca isquémica preestablecida y periodontitis. Para ello, se realizaron tomas de sangre previa al tratamiento y a los 10 minutos de comenzar el tratamiento, con el fin de analizar la presencia de las bacterias seleccionadas. Además, se realizaron tomas de muestras microbiológicas provenientes del surco gingival y se comparó los recuentos totales e individuales de bacterias específicas al inicio y a los 6 meses, para el efecto del tratamiento periodontal. Y se valoraron todos los parámetros periodontales clínicos al inicio, 1 mes, 3 meses y 6 meses.

Bacteriemia

En relación con las **muestras de sangre (bacteriemia)**, diversos estudios han demostrado bacteriemias tras la realización de una profilaxis profesional y tras realizar un raspado y alisado radicular. Forner y colaboradores (*Forner et al.* 2006) observaron una prevalencia de detección de bacteriemias de un 75%, tras raspado y alisado y empleando la técnica cultivo de lisis-filtración. Por otro lado, Kinane y colaboradores (*Kinane et al.* 2005) detectaron también mediante técnicas de cultivo y tras la realización de una profilaxis supragingival una prevalencia de 13%, la cual aumentaba a un 23% si se empleaba la técnica molecular de PCR. Es decir, que aumentaba en un 10% la prevalencia de detección cambiando la técnica de detección.

Olsen y colaboradores (*Olsen et al.* 2008) concluyeron que la prevalencia de bacteriemias tras el tratamiento periodontal básico puede llegar hasta el 70%. Castillo y colaboradores (*Castillo et al.* 2011) detectaron la presencia de patógenos periodontales en sangre tras raspado y alisado en el 54,8% de los pacientes (empleando tanto técnicas de cultivo, detectando bacteriemias en un 47,6% de los pacientes, como técnicas moleculares, detectando bacteriemias en el 19% de los pacientes). En un 16,6% de los sujetos se pudo detectar patógenos en sangre previo al tratamiento. Además, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* fueron los patógenos que se detectaron con mayor frecuencia, tanto antes como después del tratamiento (inmediatamente después del tratamiento, a los 15 minutos tras finalizar el tratamiento y a los 30 minutos).

La revisión sistemática realizada por Horliana y colaboradores (*Horliana et al.* 2014) muestra un 46% de prevalencia de sujetos con bacteriemias tras realizar tratamiento periodontal no quirúrgico, encontrando como los patógenos principales detectados *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. micras*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus parasanguis*, y algunas especies de *Actinomyces*, *Streptococcus Enterococcus*.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, ya que los análisis mediante cultivo no pudieron demostrar el paso de ninguna especie bacteriana analizada al torrente sanguíneo en ningún sujeto de estudio.

Las bacteriemias están caracterizadas por muy bajas concentraciones de bacterias en sangre y por lo tanto la sensibilidad cuando se emplean métodos de cultivo es crucial. En nuestro estudio, empleamos una técnica de cultivo directo sobre placas de Agar

sangre y placas con medio Dentaid, el cual generalmente no es empleado en estudios de bacteriemias orales, Forner y colaboradores (*Forner et al.* 2006) encuentran que el método de cultivo de lisis-filtración mostró una sensibilidad amentada en comparación con la técnica BACTEC. Ambos métodos, sin embargo, requieren pasos posteriores para la identificación de las bacterias, aumentando la posibilidad de contaminación.

Castillo y colaboradores (*Castillo et al.* 2011) así como Savarrio y colaboradores (*Savarrio et al.* 2005) encuentran que el método de cultivo directo es el de elección para la detección de bacteriemias en comparación con la PCR. No obstante, estos resultados se oponen a los encontrados por Kinane y colaboradores (*Kinane et al.* 2005), en el cual se vio que la PCR era superior, observándose una diferencia de un 10% en la detección entre cultivo y PCR (siendo de 13% y 23%, respectivamente).

En un estudio in vitro realizado por Marin y colaboradores (*Marin et al.* 2017) en el que se compara la detección de varios métodos microbiológicos (cultivo y PCR), los resultados indican que el análisis directo mediante cultivo parece ser el más adecuado para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. No obstante, al ser un estudio in vitro estos resultados han de ser analizados con prudencia.

Analizando estos datos parece que en la literatura todavía ningún **método de detección** destaca claramente sobre otro, por lo que existe la posibilidad de que, empleando otro método, como la PCR, se hubiese obtenido datos de bacteriemias.

La mayor disparidad entre los estudios analizados y el presente estudio se encuentra principalmente en los **tiempos en los que se extrae sangre** para su análisis. En el presente estudio se toman muestras inmediatamente, previo a empezar el tratamiento y a los 10 minutos de haber empezado el tratamiento. En el estudio realizado por Forner y colaboradores (*Forner et al.* 2006) se toman muestras previo al tratamiento, a los 0,5 minutos, a los 10 minutos y a los 30 minutos de haber comenzado el tratamiento. Un protocolo parecido fue seguido por Castillo y colaboradores (*Castillo et al.* 2011 (previo al tratamiento, inmediatamente tras el tratamiento, a los 15 y a los 30 minutos tras el tratamiento)).

Con respecto al **tamaño muestral**, este es esencial a la hora de establecer diferencias estadísticamente significativas. En los estudios publicados, varía entre 28 y 114 sujetos, destacando el estudio realizado por Herrera y colaboradores (*Herrera et al.* 2008) que incluyó 114 pacientes con periodontitis crónica. El presente trabajo fin de Máster, sin embargo, analiza los datos de sólo 6 pacientes, por lo que es probable que los resultados serán más evidentes cuando se realice el análisis de datos del estudio general.

En cuanto al **tiempo de seguimiento**, la mayor parte de los estudios que evalúan la presencia de bacteriemias tras algún tratamiento periodontal, antes de la realización del tratamiento y minutos después. Destaca el estudio de Kinane y colaboradores (*Kinane et al.* 2005) que tiene un periodo de seguimiento de 2 semanas. El presente estudio, tiene un periodo de seguimiento de 6 meses para realizar una comparativa con respecto a las muestras microbiológicas provenientes del surco gingival inicial y al finalizar el estudio y analizar variaciones relacionadas con el efecto del tratamiento. No obstante, los resultados de las muestras microbiológicas orales demuestran que no hay diferencias entre los datos basales y finales, aún habiendo resultados positivos a nivel

de variables periodontales. Los datos de este estudio están en concordancia con los resultados del estudio realizado por Haffajee y colaboradores (*Haffajee et al.* 2008), en el que se redujo los recuentos de las especies pertenecientes al complejo rojo a los 12 meses después del tratamiento, sin embargo, estas diferencias tampoco fueron significativas.

Socransky y colaboradores (*Socransky et al.* 2013) demostraron que el tratamiento periodontal provocó una disminución en el recuento total de patógenos periodontales hasta 2 años después del tratamiento. No obstante, los pacientes de este estudio estuvieron incluidos en un programa de mantenimiento. Otros estudios han demostrado la reducción en el recuento de patógenos periodontales en periodos mayores a 6 meses, pero la mayoría incluyen el uso de antimicrobianos (*Colombo et al.* 2012, *Krück et al.* 2012, *Faveri et al.* 2014).

Datos microbiológicos

El análisis mediante cultivo revela que, al inicio del estudio, las bacterias con mayor frecuencia de detección en ambos grupos fueron *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum*, siendo detectadas en todos los pacientes incluidos en el estudio. De estas bacterias, la que presentaba mayores recuentos y porcentajes fue *P. gingivalis* (de media 7,119 logUFC/mL 45,59% para el grupo control y 6,872 logUFC/mL y 39,52% para el grupo test).

A los 6 meses, nuevamente *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* fueron las bacterias con mayor frecuencia de detección (*P. gingivalis* no siendo detectada únicamente en un paciente del grupo control, *P. intermedia* en un paciente del grupo test y *F. nucleatum* en un paciente del grupo test). De estas bacterias, *F. nucleatum* fue la bacteria con mayores recuentos en el grupo control (4,566 logUFC/mL), mientras que en el grupo test *P. gingivalis* fue la que presentó mayores recuentos (5,876 log UFC/mL). Según el estudio realizado por Herrera y colaboradores (*Herrera et al.* 2008), analizando los datos de pacientes en España, se observa como las bacterias con mayor frecuencia de detección fueron *F. nucleatum* (frecuencia de 100%), encontrando en segundo lugar a *P. intermedia* (con una frecuencia de 97,2%) y, en tercer lugar, a *P. gingivalis* (con una frecuencia de 77,8%).

Resultados muy similares a los presentados por este estudio son los proporcionados por Sanz y colaboradores que, encontraron una prevalencia del 100% de *F. nucleatum*, del 74,2% de *P. intermedia* y 64,5%, tanto *P. gingivalis* como *T. forsythia*, en pacientes españoles con periodontitis (*Sanz et al.* 2000).

Comparando los resultados de estos estudios con los del presente estudio vemos como existe una discrepancia principalmente con respecto a la frecuencia de detección de *P. gingivalis*, pues en este estudio es la que posee la mayor prevalencia de detección. No obstante, vemos como las 3 especies más encontradas en los pacientes de este estudio si concuerdan con ambos estudios realizados previamente (*P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum*).

T. forsythia al inicio de nuestro estudio, fue detectada en 2 de los 3 pacientes pertenecientes al grupo control (66,7%) y en los 3 pacientes del grupo test (100%), lo cual representa también una prevalencia de detección muy elevada, estando en concordancia con los datos de Sanz y colaboradores (*Sanz et al.* 2000). A los 6 meses,

esta bacteria fue detectada en el grupo control únicamente en 1 paciente (33,3%) y en 2 pacientes en el grupo test (66,7%).

Con respecto a *A. actinomycetemcomitans*, una de las bacterias consideradas como patógeno periodontal, ambos estudios encuentran una frecuencia de aparición baja (3,2% el estudio realizado por Sanz y colaboradores (Sanz et al. 2000) y 16,7% el realizado por Herrera y colaboradores (Herrera et al. 2008). Otro estudio realizado por Mínguez y colaboradores (Mínguez et al. 2014) evaluaron la prevalencia de este patógeno en una muestra de 701 sujetos, incluyendo pacientes con periodontitis crónica, agresiva y refractaria. Los resultados de este estudio revelan que la prevalencia de aparición del microorganismo fue de 5,7% (40 sujetos en total, de los cuales 19 tenían periodontitis crónica, 13 periodontitis agresiva y 8 periodontitis refractaria). El presente trabajo de fin de máster, no obstante, no detectó esta bacteria en ningún paciente.

Analizando los **recuentos totales** a nivel oral de las bacterias seleccionadas, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo test y el control en ninguno de los periodos del estudio. Es decir, que ambas redujeron sus recuentos a los 6 meses del tratamiento independientemente de la realización de RAR o profilaxis supragingival, de forma similar. Según lo expuesto por Teles y colaboradores (Teles et al. 2006) el tratamiento mediante profilaxis profesional obtiene una mayor reducción de recuentos bacterianos en profundidades de sondaje ≤ 3 mm, mientras que el RAR tiene mayores beneficios en bolsas > 3 mm. El hecho de que nuestro estudio refleje resultados diferentes puede deberse al reducido tamaño muestral, que limita la obtención de resultados concluyentes. Además, si en lugar de emplear como unidad el paciente, se hubiese clasificado en categorías en función de la profundidad de sondaje, es posible que los resultados se asemejasen a los obtenidos por Teles y colaboradores.

En cuanto al tratamiento periodontal, el RAR es el método más comúnmente empleado para el tratamiento de la periodontitis. Su principal objetivo es eliminar depósitos microbianos blandos y duros de las superficies radiculares. Su efecto inmediato es la disrupción en el biofilm subgingival.

La mayor parte de la literatura se ha centrado en el efecto de la instrumentación subgingival sobre diversos patógenos periodontales, teniendo un seguimiento la mayoría de estos entre 1 a 12 meses, evaluando la duración de la alteración en la composición de la microbiota y la recolonización. En general, estudios basados en técnicas de cultivo (Loos et al. 1988, Renvert et al. 1990, Sato et al. 1993, Teles et al. 2006) muestran reducciones significativas en el recuento total, así como en niveles de bacterias específicas como *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* o *E. corrodens*.

Teles et al. 2006 concluye que el tratamiento mediante profilaxis profesional tiene mayores beneficios en la disminución de recuentos bacterianos en profundidades de sondaje ≤ 3 mm, mientras que el RAR tiene mayores beneficios en bolsas > 3 mm.

Otro estudio de 6 meses de duración, realizado por Müller y colaboradores (Müller et al. 1986), demostró que una sesión de raspado y alisado radicular resultó en la reducción de profundidades de sondaje, una ganancia en los niveles de inserción clínica y un cambio en la composición de la microflora subgingival a una composición más

comúnmente hallada en salud. No obstante, las diferencias entre la microflora subgingival en sitios con ganancia de inserción tras 6 meses y las localizaciones que no respondieron al tratamiento no tuvieron diferencias significativas. Además, en este estudio los pacientes recibieron sesiones de profilaxis supragingival cada 2-4 semanas. En el presente estudio, sin embargo, no hemos encontrado diferencias en los recuentos bacterianos entre ambos grupos de tratamiento evaluados. Esto puede deberse a la baja muestra (n = 6) del estudio y a que la periodontitis de los pacientes evaluados en general no es muy avanzada, sino más bien moderada.

Estudios más recientes han evaluado el efecto a nivel microbiológico del RAR sobre patógenos periodontales empleando técnicas moleculares. Darby y colaboradores (*Darby et al. 2005*) encontraron que no había diferencias estadísticamente significativas en cuanto a cambios en la microflora oral empleando la técnica de la PCR, aún habiendo beneficios en las variables periodontales.

Datos periodontales

Con respecto a los resultados periodontales, se observa como el tratamiento periodontal logra una reducción significativa en el nivel de inserción periodontal a los 6 meses con respecto a la visita basal ($p = 0,046$), como era esperable y en concordancia con otros estudios (*Ide et al. 2003, Taylor et al. 2010, Kamil et al. 2011*). No obstante, no se observan diferencias intergrupo entre las dos modalidades de tratamiento empleadas, RAR para grupo test y profilaxis profesional para grupo control. Esto es equiparable a los resultados obtenidos en este estudio para otras variables como profundidad de sondaje, recesiones o sangrado en las que no hay diferencias intergrupo. El estudio realizado por Tonetti y colaboradores (*Tonetti et al. 2007*), el cual sigue un protocolo de tratamiento parecido al realizado en el presente estudio clínico, encuentra diferencias significativas entre ambos grupos en la presencia de bolsas periodontales, placa y sangrado a los 2 y a los 6 meses.

El efecto Hawthorne, por el cual existe una motivación por parte de los pacientes en mejorar su higiene por el hecho de participar en un estudio clínico, puede ser el responsable de no encontrar diferencias intergrupo. Además, se ha incluido pacientes con periodontitis moderada-avanzada y es probable que habiendo incluido únicamente periodontitis avanzadas se observasen diferencias entre los grupos de tratamiento.

Limitaciones del estudio

Es posible que el presente trabajo fin de máster no haya sido capaz de identificar bacteriemias, ni claras diferencias clínicas y microbiológicas entre los dos grupos de estudio, debido al reducido tamaño de la muestra.

Al ser el paciente la unidad de estudio y realizarse una media de las profundidades de sondaje, se pierde información de los efectos del tratamiento en función de la profundidad de sondaje de las bolsas. Sería interesante estratificar en bolsas superficiales ($PS \leq 3\text{mm}$), moderadas ($PS 4-6\text{mm}$) y profundas ($>5\text{mm}$). Lo mismo los resultados clínicos, microbiológicos y en sangre hubieran sido diferentes en las bolsas profundas, dependiendo del tratamiento realizado (profilaxis o raspado y alisado radicular)

Además, es posible que el método de cultivo empleado para identificar la bacteriemia no haya sido el más específico y el momento de la toma de muestras afecte al resultado.

Todas estas limitaciones, se intentará subsanar cuando se presenten los resultados de los 120 pacientes que se pretenden estudiar en la investigación.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. No se pudo obtener datos de bacteriemias, por lo tanto, no es posible proporcionar conclusiones con respecto a la detección y cuantificación de niveles de bacterias periodontales que ingresan al torrente sanguíneo durante el tratamiento periodontal básico.
2. El tratamiento periodontal básico mejora los parámetros microbiológicos periodontales de los pacientes, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo test y el grupo control a lo largo del periodo de estudio.
3. El tratamiento periodontal básico mejora los parámetros clínicos periodontales, no obstante, nuevamente no se obtuvieron diferencias significativas en comparación con el grupo control durante los 6 meses de seguimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alsina, M., Olle E Fau - Frias, J. & Frias, J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- 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.
- Bouchard, P., Boutouyrie, P., D'aiuto, F., Deanfield, J., Deliargyris, E., Fernandez-Avilés, F., Hughes, F., Madianos, P., Renvert, S. & Sanz, M. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *European Heart Journal Supplements*, 12, B13-B22.
- Braunwald, E. 1996. Acute myocardial infarction--the value of being prepared. *N Engl J Med*, 334, 51-2.
- Bravo-Pérez Manuel, Casals-Peidró Elías, Cortés-Martinicorena Fco. Javier, Llodra-Calvo Juan Carlos, Álvarez-Arenas Pardina Ignacio, Hermo-Señariz Patricia et al. Encuesta de Salud Oral en España 2005. RCOE
- 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.
- Castillo, D. M., Sánchez-Beltrán, M. C., Castellanos, J. E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M., & Lafaurie, G. I. (2011). *Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 418–427.

- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., ... Tonetti, M. S. (2018). *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. Journal of Clinical Periodontology, 45, S1–S8.*
- Chou, H. H., Yumoto, H., Davey, M., Takahashi, Y., Miyamoto, T., Gibson, F. C. 3rd & 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.*
- Claesson, R., Lagervall, M., Hoglund-Aberg, C., Johansson, A. & Haubek, D. 2011. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol, 38, 115-21.*
- Colombo, A. P. V., Bennet, S., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., ... Paster, B. J. (2012). Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison Between Good Responders and Individuals With Refractory Periodontitis Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *Journal of Periodontology, 83(10), 1279–1287.*
- Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., & Heitz-Mayfield, L. J. A. (2009). *Bacteraemia due to dental flossing. Journal of Clinical Periodontology, 36(4), 323–332.*
- Daly, C. G., Mitchell, D. H., Highfield, J. E., Grossberg, D. E., & Stewart, D. (2001). *Bacteremia Due to Periodontal Probing: A Clinical and Microbiological Investigation. Journal of Periodontology, 72(2), 210-214.*
- Darby, I. B., Hodge, P. J., Riggio, M. P., & Kinane, D. F. (2005). *Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology, 32(2), 200–206.*
- Darby, I. B., Mooney, J., & Kinane, D. F. (2001). *Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. Journal of Clinical Periodontology, 28(8), 796–805.*

- 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.
- 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.
- Faveri, M., Rebello, A., de Oliveira Dias, R., Borges-Junior, I., Duarte, P. M., Figueiredo, L. C., & Feres, M. (2014). *Clinical and Microbiologic Effects of Adjunctive Metronidazole Plus Amoxicillin in the Treatment of Generalized Chronic Periodontitis: Smokers Versus Non-Smokers*. *Journal of Periodontology*, 85(4), 581–591.
- Figuero, E., Sánchez-Beltran, 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.
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. & Holmstrup, P. 2006. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, 33, 401-7.
- 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., Patel, M., & Socransky, S. S. (2008). Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 148–157.
- 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. 3rd, Hamilton, J. A. & Genco, C. A. 2011. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*, 215, 52-9.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontology* 2000. 2010;54:78–105.
- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 106–113.
- Horliana, A. C., Chambrone, L., Foz, A. M., Artese, H. P., Rabelo Mde, S., Pannuti, C. M. & Romito, G. A. 2014. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*, 9, e98271.
- Humphrey, L. L., Fu, R., Buckley, D. I., Freeman, M., & Helfand, M. (2008). *Periodontal Disease and Coronary Heart Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. Journal of General Internal Medicine, 23(12), 2079–2086.*
- 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. Journal of Clinical Periodontology, 30(4), 334–340.*
- 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.
- Kamil, W., Al Habashneh, R., Khader, Y., Al Bayati, L., & Taani, D. (2011). *Effects of nonsurgical periodontal therapy on C-reactive protein and serum lipids in Jordanian adults with advanced periodontitis. Journal of Periodontal Research, no–no.*
- 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.

- Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D., & Shearer, B. (2005). *Bacteraemia following periodontal procedures. Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 708–713.
- 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.
- Krück, C., Eick, S., Knöfler, G. U., Purschwitz, R. E., & Jentsch, H. F. R. (2012). Clinical and Microbiologic Results 12 Months After Scaling and Root Planing With Different Irrigation Solutions in Patients With Moderate Chronic Periodontitis: A Pilot Randomized Trial. *Journal of Periodontology*, 83(3), 312–320.
- 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.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C., & Silva, A. (2004). *Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in subgingival plaque samples. Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1061–1069.
- Loos, B., Claffey, N., & Egelberg, J. (1988). *Clinical and microbiological effects of root debridement in periodontal furcation pockets. Journal of Clinical Periodontology*, 15(7), 453–463.
- Loza Fernández De Boadilla, E. P. R., A; Rodriguez, M 2003. Procedimientos de Microbiología Clínica 3: Hemocultivos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Marin, M. J., Ambrosio, N., Virto, L., Diz, P., Álvarez, M., Herrera, D., Sanz, M. & Figuero, E. 2017. Detection and quantification of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 74, 55-62.
- Mattila, K. J., Niemnen, 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.
- Meyer, D. H., Sreenivasan, P. K., Fives-Taylor, P. M (1991) Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity* 59, 2719-2726.
- Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, E., Segal, N. L., ... Pihlstrom, B. L. (1991). *Periodontal Findings in Adult Twins. Journal of Periodontology*, 62(5), 293–299.
- Mínguez, M., Pousa, X., Herrera, D., Blasi, A., Sánchez, M. C., León, R., & Sanz, M. (2014). *Characterization and serotype distribution of Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolated from a population of periodontitis patients in Spain. Archives of Oral Biology*, 59(12), 1359–1367.
- Mombelli, A., Almaghlouth, A., Cionca, N., Cancela, J., Courvoisier, D. S., & Giannopoulou, C. (2017). *Microbiologic Response to Periodontal Therapy and Multivariable Prediction of Clinical Outcome. Journal of Periodontology*, 88(12), 1253–1262.
- Mombelli, A., McNabb H Fau - Lang, N. P. & Lang, N. P. 1991. Black-pigmenting gram- negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*.
- Müller HP, Hartmann J, Flores-de-Jacoby L. Clinical alterations in relation to the morphological composition of the subgingival microflora following scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 825–832.
- 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.
- Olsen, I. 2008. Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfus Apher Sci*, 39, 173-8.
- Page, r. C., & Kornman, k. S. (1997). *The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontology 2000*, 14(1), 9–11.
- 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.
- 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.
- Renvert, S., Pettersson T Fau - Ohlsson, O., Ohlsson O Fau - Persson, G. R. & Persson, G. R. 2006. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome.
- 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., Beck, J. D. & Offenbacher, S. (1998) PGE2, IL-1b and TNF-a responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Annals of Periodontology* 3, 40–50.
- 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., 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.
- Sato, K., Yoneyama, T., Okamoto, H., Dahlen, G., & Lindhe, J. (1993). *The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. Journal of Clinical Periodontology*, 20(5), 359–365.
- Savarrio, L., MacKenzie, D., Riggio, M., Saunders, W. P. & Bagg, J. (2005) Detection of bacteraemias during non-surgical root canal treatment. *Journal of Dentistry* 33, 293–303.

- 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.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Teles, R., Wennstrom, J. L., Lindhe, J., Bogren, A., ... Goodson, J. M. (2013). Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(8), 771–780.
- Taylor, B., Tofler, G., Morel-Kopp, M.-C., Carey, H., Carter, T., Elliott, M., ... Schenck, K. (2010). *The effect of initial treatment of periodontitis on systemic markers of inflammation and cardiovascular risk: a randomized controlled trial. European Journal of Oral Sciences*, 118(4), 350–356.
- Teles, R. P., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. 2006. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*, 42, 180-218.
- 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.
- Tonetti, M. S., D’Aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., ... Deanfield, J. (2007). *Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. New England Journal of Medicine*, 356(9), 911–920.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). *Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. Journal of Clinical Periodontology*, 45, S149–S161.
- 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.

- 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.
- Zhang, W., Daly, C. G., Mitchell, D., & Curtis, B. (2012). *Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 41–52.