

Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes

Ricardo Andreu Martínez

Tesis doctoral UDC / 2022

Directores

Dr. Sergio Santos del Riego

Dr. Francisco Payri González

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes

Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la Universidade da Coruña

El Dr. Sergio Eduardo Santos del Riego y el Dr. Francisco Payri González

Exponen:

Que D. Ricardo Andreu Martínez, Médico Especialista en Estomatología, ha realizado bajo nuestra supervisión y dirección el trabajo titulado “Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes”.

Que este trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor.



“Cuando cambias la forma en la que observas las cosas,
las cosas que observas cambian”

Max Karl Ernst Ludwig Planck

AGRADECIMIENTOS

A mi director y tutor de tesis, el Dr. Sergio Eduardo Santos del Riego, al Dr. Francisco Payri González como codirector, al Dr. José Manuel Cruz Valiño por creer en mí y a todos ellos por su dedicación, sin la cual no hubiese sido posible culminar este proyecto.

A todas mis compañeras de AndreuDental, María Dolores Sempere, María José Barrachina, Isabel Serrano y Vanesa Pérez por hacer fácil lo difícil y prestarme su apoyo incondicional. Igualmente, mi agradecimiento a la Dra. María Teresa Martínez Herrera por su soporte y al laboratorio Ivonne Herrero por su colaboración.

A mi esposa la Dra. María José Sempere y a mis hijas Marta y María por la paciencia y apoyo que han mostrado durante estos años.

Gracias a todos por su apoyo en este ejercicio de superación.

Valencia, en septiembre de 2021

**RESUMEN/
RESUMO/
ABSTRACT**

**RESUMEN
EXTENDIDO**

RESUMEN

En pacientes con enfermedad periodontal parece existir un riesgo aumentado de algunas enfermedades sistémicas, aunque no es evidente que esta asociación sea causal. Los objetivos de esta tesis fueron aclarar la relación entre la enfermedad periodontal y el nivel de los marcadores inflamatorios proteína C reactiva ultrasensible y fibrinógeno, y de los marcadores prooxidantes, malondialdehído y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, así como la acción de la doxiciclina tópica en el tratamiento periodontal. Se estudió una población con enfermedad periodontal que iba a ser sometida a tratamiento y que, al cabo de tres meses, debía permitir evidenciar la eficacia y comparar dos grupos de pacientes, con doxiciclina y control. Los resultados muestran que los parámetros periodontales mejoraron en ambos grupos, mostrando el fibrinógeno una reducción significativa en el primer grupo. Igualmente, se observó una correlación no significativa entre los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en orina y el índice de sangrado a sondaje. En conclusión, los hallazgos del presente estudio apoyan el concepto, que defiende el hecho, por el cual, en los enfermos con enfermedad periodontal, sobre todo en estadios avanzados, se produce un aumento de los niveles de los mediadores sistémicos de la inflamación que, por otra parte, son factores de riesgo para el desarrollo de patologías crónicas.

RESUMO

En pacientes con enfermidade periodontal parece existir un risco aumentado dalgunhas enfermidades sistémicas, aínda que non é evidente que esta asociación sexa causal. Os obxectivos desta tese foron aclarar a relación entre a enfermidade periodontal e o nivel dos marcadores inflamatorios, proteína C reactiva ultrasensible e fibrinógeno, e dos marcadores prol-oxidantes malondialdehído e 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, así como a acción da doxiciclina tópica no tratamento periodontal. Estudouse unha poboación con periodontite que ía ser sometida a tratamento e que, ao cabo de tres meses, debía permitir evidenciar a eficacia e comparar dous grupos de pacientes, con doxiciclina e control. Os resultados mostran que os parámetros periodontales melloran en ambos os grupos, mostrando o fibrinógeno unha redución significativa no primeiro grupo. Igualmente, observouse unha correlación non significativa entre os niveis de 8- hidroxi-2' - desoxiguanosina en ouriños e o índice de sangrado a sondaxe. En conclusión, os resultados deste estudo avalan o concepto, que defende o feito de que os pacientes con periodontite, sobre todo en fases avanzadas, se produzan un aumento dos niveis de mediadores sistémicos da inflamación que, por outra banda, son de risco para o desenvolvemento de patoloxías crónicas.

ABSTRACT

An increased risk of some systemic diseases is present in patients with periodontal disease, although it remains unknown if this association is due to a causal relationship. This thesis aims to clarify the relationship between periodontal disease and the level of inflammatory markers ultrasensitive C-reactive protein and fibrinogen and pro-oxidant markers malondialdehyde and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as well as the action of topical doxycycline in periodontal treatment. We studied a population with periodontal disease that was going to undergo treatment and that, after three months, should allow evidence of the effectiveness and compare two groups of patients, with doxycycline and control. Results show that periodontal parameters improve in both groups, with fibrinogen showing a significant reduction in the first group. Likewise, a non-significant correlation was observed between the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine and the bleeding index on probing. It is concluded that the findings of the present study support the concept, which defends the fact, by which patients with periodontal disease, especially in advanced stages, there is an increase in the levels of systemic mediators of inflammation that, on the other hand, are risk factors for the development of chronic pathologies.

RESUMEN EXTENDIDO

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso e inflamatorio de las estructuras de soporte del diente, resultado de la interacción entre la infección por bacterias patógenas y la respuesta inmune del huésped. En pacientes con enfermedad periodontal, en comparación con aquellos que gozan de buena salud periodontal, parece existir un riesgo aumentado de algunas enfermedades sistémicas en general y de arteriopatía coronaria en particular. No es evidente que esta asociación sea causal, y por lo tanto podría considerarse un factor independiente para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

OBJETIVOS

La tesis que se plantea tiene como objetivo el estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y el nivel de los marcadores inflamatorios proteína C reactiva ultrasensible y fibrinógeno, y de los marcadores prooxidantes, malondialdehído y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, así como la acción de la doxiciclina tópica como medicación adyuvante en el tratamiento periodontal.

METODOLOGÍA

Se parte de una población con enfermedad periodontal que va a ser sometida a tratamiento con un objetivo terapéutico; el diseño del estudio se correspondió con el de un ensayo clínico con características prospectivas, analíticas y experimentales, que permitió evidenciar la eficacia del tratamiento periodontal y comparó dos grupos de pacientes; uno a los que se les aplicó doxiciclina tópica y al grupo control donde no se aplicó.

Para alcanzar los objetivos que se plantearon, el trabajo se estructuró en tres partes: la primera tuvo fines analíticos y consistió en un estudio periodontal, que se realizó en el momento del diagnóstico, así como un análisis de sangre y orina, con el que se determinó el nivel sérico de los marcadores inflamatorios y prooxidantes. La segunda parte tuvo carácter intervencionista, en la que se sometió a todos los pacientes a tratamiento periodontal no quirúrgico y, además, se aplicó doxiciclina tópica a la mitad de los pacientes

del grupo de tratamiento. En la tercera parte se realizó un nuevo estudio periodontal tres meses después y se determinaron, nuevamente, los niveles de los marcadores inflamatorios y prooxidantes.

RESULTADOS

Se observaron múltiples correlaciones de los parámetros clínicos periodontales relacionados con el sondaje, así como el índice de sangrado al sondaje con los niveles séricos de fibrinógeno ($r=0,320$; $p=0,007$) y una diferencia significativa entre los grupos por severidad de enfermedad periodontal en los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina ($p=0,021$). Los parámetros periodontales mejoraron en ambos grupos, mostrando el fibrinógeno una reducción significativa en el grupo tratado con doxiciclina ($p=0,018$), igualmente se observó en el mismo grupo, una correlación significativa entre los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en orina y el índice de sangrado al sondaje ($p=0,018$).

CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente estudio apoyan el concepto de que la enfermedad periodontal, sobre todo en estadios avanzados, aumenta los niveles de los mediadores sistémicos de la inflamación y que, por otra parte, son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Por lo tanto, se sugiere el papel que la inflamación sistémica de bajo grado puede tener en el desarrollo de las patologías crónicas, e indica que los niveles de proteína C reactiva ultrasensible y fibrinógeno pueden servir como biomarcadores importantes para evaluar el posible riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedad periodontal. Como consecuencia, se puede inferir que, como enfermedad inflamatoria local, da lugar a un aumento del estrés oxidativo a nivel sistémico, y puede estar involucrada en el desarrollo y perpetuación de las otras enfermedades inflamatorias, abriendo de esta forma paso a nuevas estrategias terapéuticas.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad periodontal; periodontitis; inflamación; 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; malondialdehído; estrés oxidativo.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	3
1.1.1 <i>Definición y clasificación de la enfermedad periodontal</i>	3
1.1.2 <i>Etiología y patogenia de la enfermedad periodontal</i>	9
1.1.2.1 Etiología infecciosa. El <i>biofilm</i>	9
1.1.2.2 Respuesta inmune.....	12
1.1.2.3 Factores genéticos	13
1.1.2.4 Factores ambientales y de perfil	16
1.1.3 <i>Epidemiología de la enfermedad periodontal</i>	17
1.1.4 <i>Tratamiento no quirúrgico de la enfermedad periodontal</i>	18
1.1.4.1 La doxiciclina tópica como medicación adyuvante	19
1.2 ASOCIACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LAS ENFERMEDADES SISTÉMICAS.....	21
1.2.1 <i>Evidencias de asociación entre la enfermedad periodontal y el riesgo cardiovascular</i>	23
1.2.2 <i>Mecanismos de asociación entre la enfermedad periodontal y el riesgo cardiovascular</i>	24
1.2.2.1 Evaluación de la inflamación sistémica y del estrés oxidativo en la enfermedad periodontal.....	26
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. METODOLOGÍA	43

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	45
5.1.1 Tipo de estudio.....	45
5.1.2 Periodo del estudio.....	45
5.2 SELECCIÓN DE PACIENTES Y TAMAÑO DE LA MUESTRA	46
5.2.1 Selección de pacientes.....	46
5.2.2 Tamaño de la muestra	46
5.2.3 Criterios de inclusión	47
5.2.4 Criterios de exclusión	47
5.3 VARIABLES DEL ESTUDIO	48
5.3.1 Variables sociodemográficas y de confusión.....	48
5.3.2 Variables clínicas periodontales.....	48
5.3.3 Variables bioquímicas proinflamatorias	50
5.3.4 Variables bioquímicas de estrés oxidativo	50
5.4 PROCEDIMIENTO.....	51
5.4.1 Protocolo del estudio y recogida de datos	52
5.4.2 Análisis estadístico	54
5.5 ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES.....	57
6. RESULTADOS	59
6.1 ESTUDIO TRANSVERSAL. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN	61
6.1.1 Estudio de la severidad de la enfermedad periodontal.....	61
6.1.2 Homogeneidad de los grupos según estadio de la enfermedad periodontal.....	62
6.1.3 Comparación de los grupos por estadio de la enfermedad periodontal	63
6.1.4 Estudio de la probabilidad de la enfermedad periodontal. Regresión logística binaria.....	68
6.1.5 Correlaciones bivariadas de las variables periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo a nivel basal.....	70
6.1.6 Regresión lineal multivariante	72
6.2 ESTUDIO EXPERIMENTAL. RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL	75
6.2.1 Homogeneidad de los grupos DOX y control.....	75

6.2.2 Respuesta al tratamiento periodontal según grupo DOX vs grupo control.....	79
6.2.3 Respuesta al tratamiento según estadio de la enfermedad periodontal en el grupo control.....	83
6.2.4 Correlaciones después del tratamiento periodontal no quirúrgico.....	89
6.2.5 Regresión lineal multivariante con variables postratamiento	93
7. DISCUSIÓN	97
7.1 ASOCIACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA	99
7.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO QUIRÚRGICO	107
7.2.1 Efectos del tratamiento sobre las variables clínicas periodontales.....	108
7.2.2 Efectos del tratamiento sobre los parámetros inflamatorios.....	108
7.2.3 Efectos del tratamiento periodontal sobre los parámetros prooxidantes.....	110
7.3 EFECTO ADYUVANTE DE LA DOXICICLINA TÓPICA A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO	112
7.4 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	117
8. CONCLUSIONES.....	119
9. BIBLIOGRAFÍA.....	123
10. ANEXOS	159
ANEXO I. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES.....	163
I. 1 Certificado Comité Ético de Investigación Clínica.....	163
I. 2 Certificado de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	169
I. 3 Hoja de información al paciente	173
I. 4 Consentimiento informado y Ley Orgánica de Protección de Datos	179
ANEXO II: MATERIAL PARA LA RECOGIDA DE DATOS.....	187
II. 1 Ficha del paciente y periodontograma.....	187
ANEXO III: PUBLICACIONES	191
III. 1 Publicaciones en acceso abierto.....	191
III. 2 Publicación Journal Citation Reports.....	201

ABREVIATURAS

<i>AAP</i>	Asociación Americana de Periodoncia
<i>ADN</i>	ácido desoxirribonucleico
<i>AGES</i>	productos avanzados de glicosilación
<i>AINES</i>	antiinflamatorios no esteroideos
<i>BOP</i>	índice de sangrado al sondaje
<i>DM</i>	diabetes mellitus
<i>DOX</i>	grupo doxiciclina
<i>EFP</i>	Federación Europea de Periodoncia
<i>EP</i>	enfermedad periodontal
<i>GUN</i>	gingivitis úlceronecrotizante
<i>HbA1c</i>	hemoglobina A1c
<i>HLA</i>	antígeno leucocitario humano
<i>ICAM-1</i>	molécula de adhesión intercelular 1
<i>Ig</i>	inmunoglobulina
<i>IgA</i>	inmunoglobulina A
<i>IgG</i>	inmunoglobulina G
<i>IL</i>	interleucina
<i>IL1β</i>	interleucina 1 beta
<i>IP</i>	índice de placa
<i>LDL</i>	lipoproteína de baja densidad
<i>LOPD</i>	Ley Orgánica de Protección de Datos
<i>LPO</i>	peroxidación lipídica
<i>MCP-1</i>	proteína quimiotáctica de monocitos 1
<i>MDA</i>	malondialdehído
<i>MMP</i>	metaloproteinasa

<i>NAT2</i>	N acetiltransferasa 2
<i>NF-Kβ</i>	factor de transcripción nuclear kappa beta
<i>OHdG</i>	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
<i>OR</i>	odds ratio
<i>PAI-1</i>	inhibidor del activador del plasminógeno 1
<i>PCR</i>	proteína C reactiva
<i>PCRs</i>	proteína C reactiva ultrasensible
<i>PGE</i>	prostaglandina E
<i>PIC</i>	pérdida de inserción clínica
<i>PMN</i>	leucocitos polimorfonucleares
<i>PS</i>	profundidad de sondaje
<i>PUN</i>	periodontitis úlcernecrotizante
<i>RAGES</i>	receptores de los productos avanzados de glicosilación
<i>RANKL</i>	factor nuclear kappa beta ligando
<i>RI</i>	resistencia insulínica
<i>ROS</i>	especies reactivas de oxígeno
<i>STROBE</i>	<i>Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology</i>
<i>TGFβ</i>	factor de crecimiento transformador beta
<i>Th</i>	linfocitos T colaboradores
<i>TLR</i>	receptores <i>toll like</i>
<i>TNFα</i>	factor alfa de necrosis tumoral
<i>UA</i>	unidades arbitrarias
<i>VCAM-1</i>	molécula de citoadhesión vascular 1
<i>VIH</i>	virus de inmunodeficiencia humana
<i>VLDL</i>	lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias de la Academia Americana de Periodoncia y Federación Europea de Periodoncia (2018)	5
Tabla 2. Clasificación de la salud y alteraciones gingivales inducidas por placa de la Academia Americana de Periodoncia y Federación Europea de Periodoncia (2018)	6
Tabla 3. Clasificación de la enfermedad periodontal por estadios, según la gravedad del diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales.....	8
Tabla 4. Clasificación de la enfermedad periodontal por grados, basada en evidencia directa, evidencia indirecta y factores modificadores.	9
Tabla 5. Variables de perfil de los pacientes según estadio.....	62
Tabla 6. Parámetros periodontales (t0) de la población total según estadio.....	64
Tabla 7. Parámetros inflamatorios a nivel basal (t0) de la población total según estadio ..	66
Tabla 8. Parámetros de estrés oxidativo a nivel basal (t0) de la población total según estadio.	67
Tabla 9. Perfil demográfico y clínico de los pacientes según enfermedad periodontal grado III-IV.....	68
Tabla 10. Perfil demográfico y clínico de los pacientes según enfermedad periodontal grado IV.....	69
Tabla 11. Correlación de parámetros periodontales con inflamatorios y prooxidantes en t0.	71
Tabla 12. Correlación de parámetros inflamatorios y prooxidantes en t0.	71
Tabla 13. Modelo de regresión multivariante del fibrinógeno.	72
Tabla 14. Variables de perfil de los pacientes según grupos DOX vs grupo control.	76
Tabla 15. Parámetros periodontales a nivel basal (t0) según grupo DOX vs grupo control.	77

Tabla 16. Parámetros inflamatorios a nivel basal (t0) según grupos DOX vs grupo control.	78
Tabla 17. Parámetros de estrés oxidativo a nivel basal (t0) según grupo DOX vs grupo control.....	78
Tabla 18. Parámetros periodontales en t0, t1 y diferencia t1-t0 según grupo DOX vs grupo control.....	79
Tabla 19. Parámetros inflamatorios en t0, t1 y diferencia t1-t0 según grupo DOX vs grupo control.....	80
Tabla 20. Parámetros de estrés oxidativo en t0, t1 y diferencia t1-t0 según grupo DOX vs grupo control.	82
Tabla 21. Parámetros periodontales en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.	84
Tabla 22. Parámetros inflamatorios en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.	87
Tabla 23. Parámetros de estrés oxidativo en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.....	88
Tabla 24. Correlación de los parámetros periodontales con los parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento (t1) en la población total.....	90
Tabla 25. Correlación entre parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento (t1) en la población total.	90
Tabla 26. Correlación de los parámetros periodontales con los parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento (t1) según grupo DOX vs grupo control.	91
Tabla 27. Correlación entre parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento (t1) según grupo DOX vs grupo control.	92
Tabla 28. Modelo de regresión multivariante de la variable postratamiento para PCRus...94	

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de Hart y Kornman, sobre la influencia de determinados factores genéticos en la enfermedad periodontal</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. Distribución de los pacientes según estadio</i>	<i>61</i>
<i>Figura 3. Parámetros periodontales de la muestra por estadio.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 4. Parámetros inflamatorios de la muestra por estadio</i>	<i>66</i>
<i>Figura 5. Parámetros de estrés oxidativo de la muestra por estadio.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 6. Distribución de los pacientes de ambos grupos según estadio.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 7. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros periodontales a los tres meses del tratamiento en el grupo DOX vs grupo control.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 8. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros inflamatorios a los tres meses del tratamiento en el grupo DOX vs grupo control....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 9. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros prooxidantes a los tres meses del tratamiento en el grupo DOX vs grupo control... ..</i>	<i>83</i>
<i>Figura 10. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros periodontales a los tres meses del tratamiento por estadio, grupo control</i>	<i>86</i>
<i>Figura 11. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros inflamatorios a los tres meses del tratamiento por estadio, grupo control.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 12. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros de estrés oxidativo a los tres meses del tratamiento por estadio, grupo control.</i>	<i>89</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

1.1.1 Definición y clasificación de la enfermedad periodontal

Se denomina enfermedad periodontal (EP) o periodontitis, de forma genérica, a aquella entidad patológica de origen infeccioso inflamatorio que afecta a los tejidos de soporte del diente, encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar¹, y que, en la actualidad, es definida adicionalmente aplicando los conceptos de estadios y grados.

La EP es un proceso infeccioso e inflamatorio de las estructuras de soporte del diente, resultado de la interacción entre la infección por bacterias patógenas y la respuesta inmune del huésped^{1,2}. La enfermedad se ha relacionado con algunas enfermedades sistémicas como diabetes mellitus (DM) o artritis reumatoide, entre otras, y la literatura reciente parece apuntar a un riesgo aumentado de arteriopatía coronaria en pacientes con EP. Aunque no existe evidencia de que esta asociación sea causal, la enfermedad puede considerarse un factor independiente para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares¹.

En 1923 se describe por primera vez un término específico referido a la EP, y que Pierre Fauchard comenzó denominando “escorbuto de encías”¹. Le sucedieron diferentes definiciones, como, por ejemplo, la de Orban, quien se refiere a un cuadro destructivo no inflamatorio que llamó “periodontosis”. En la década de los años veinte del siglo pasado surgieron distintas clasificaciones basadas en diversos aspectos de la enfermedad, tales como las de Gottlieb o la de Box y McCall, que hablaban de EP simple de etiología local y de EP compleja de etiología sistémica^{1,2}. En 1960, un estudio desarrollado por Loe¹, supuso un gran avance en el conocimiento de los orígenes de la enfermedad, pues atribuyó al *biofilm* un papel destacado en la patogénesis de la enfermedad y de muchos procesos crónicos. De esta década surge el concepto de EP como enfermedad inflamatoria.

La clasificación de la EP ha ido evolucionando a lo largo del tiempo, desde que Page y Schröder, en 1995, describieron en el libro titulado *Periodontitis in man and other animals* los distintos tipos de manifestaciones clínicas, de esta manera, en la clasificación de la Academia Americana de Periodoncia (AAP) de 1999² se describe la EP en las formas de presentación clínica crónica y agresiva, que sustituyen a las anteriormente denominadas como EP de adulto y de inicio temprano presentes en la clasificación de la AAP de 1989².

Durante 18 años se ha venido utilizando la clasificación de la AAP de 1999, la cual no estaba exenta de problemas, especialmente, en lo referente a la diferenciación entre las formas crónicas y agresivas de la enfermedad, aunque fuese universalmente aceptada. Desde entonces, la periodoncia ha avanzado mucho, haciéndose necesaria una actualización. Las dos principales asociaciones científicas mundiales, la AAP y la Federación Europea de Periodoncia (EFP), se reunieron en 2017 en el *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*, celebrado en Chicago, para desarrollar una nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales adaptada a los conocimientos actuales³, según se muestra en la Tabla 1.

La mayoría de los cambios con respecto a la clasificación de la AAP de 1999 están relacionados con la inclusión de una definición de salud periodontal, de la inflamación gingival inducida por el *biofilm*, de la aplicación de estadios y de grados de la nueva clasificación de la EP⁴ (Tabla 2), y que por primera vez se clasifican las enfermedades y condiciones periimplantarias junto a las periodontales.

Tabla 1. Nueva clasificación de las EP y periimplantarias de la AAP-EFP (2018).

I. Salud periodontal y enfermedades gingivales

1. Gingivitis asociada únicamente a *biofilm*
2. Gingivitis mediada por factores de riesgo sistémicos o locales
3. Hipertrofia gingival inducida por fármacos

II. EP

1. EP necrosante
1. EP como manifestación directa de enfermedades sistémicas
3. EP caracterizada adicionalmente mediante estadios y grados
4. Abscesos periodontales
5. Lesiones endodóntico periodontales

III. Trastornos del desarrollo, trastornos adquiridos y manifestaciones
periodontales de las enfermedades sistémicas

1. Enfermedades y trastornos sistémicos que afectan a los tejidos periodontales
2. Alteraciones mucogingivales en los dientes naturales
3. Trauma y fuerzas oclusales excesivas
4. Factores relacionados con prótesis dentales y dientes

IV. Patologías y condiciones periimplantarias

1. Salud periimplantaria
 2. Mucositis periimplantaria
 3. Periimplantitis
 4. Deficiencias/morfología de tejidos duros y blandos
-

Nota. Adaptado de Caton y cols. (2018)³.

Tabla 2. Clasificación de la salud y alteraciones gingivales inducidas por placa de la AAP-EFP (2018).

1. Salud periodontal

A. Salud clínica con un periodonto sano

B. Salud clínica gingival con un periodonto reducido

i) Paciente con EP estable

ii) Paciente sin EP

2. Gingivitis inducida por placa bacteriana

Periodonto intacto

Periodonto reducido en paciente sin EP

Periodonto reducido en pacientes con EP tratados con éxito

A. Asociada exclusivamente a *biofilm*

B. Mediada por factores de riesgo sistémicos o locales

i) Factores de riesgo sistémicos (factores modificantes)

a) Tabaquismo

b) Hiperglucemia

c) Factores nutricionales

d) Agentes farmacológicos

e) Hormonas sexuales esteroideas

 Pubertad

 Ciclo menstrual

 Embarazo

 Anticonceptivos orales

f) Trastornos hematológicos

ii) Factores de riesgo locales (factores predisponentes)

a) Factores retentivos de placa/*biofilm* (restauraciones)

b) Sequedad bucal

C. Hipertrofias gingivales inducidas por fármacos

Nota. Adaptado de Chapple y cols. (2018)⁴.

Con fines epidemiológicos, y para evitar sobreestimar la patología, la salud gingival se define como la presencia, durante la exploración, de < 10 % de zonas de sangrado, cuantificadas mediante el índice de sangrado al sondaje (BOP), aplicando una fuerza controlada de entre 0,2 N y 0,25 N, con profundidad de sondaje (PS) \leq 3 mm^{5,6}.

El diagnóstico de EP fue igualmente revisado, y la nueva definición propone que debe de presentar⁷:

- Pérdida de inserción clínica (PIC) interproximal de \geq 2 mm en dos o más dientes no adyacentes.
- PIC vestibular \geq 3 mm, con bolsas > 3 mm en dos o más dientes.

En cada estadio se debe describir la extensión en función del número de piezas afectadas, bien como localizada (< 30 % de los dientes afectados), o como generalizada (>30% de los dientes afectados).

- Según criterios de distribución del patrón incisivo/molar como localizada, cuando se encuentran afectadas por lo menos dos piezas (un primer molar y un incisivo u otro primer molar), o como generalizada, cuando se encuentran afectadas tres piezas distintas de incisivos y primeros molares.

La presente clasificación reconoce los problemas existentes para el diagnóstico de la EP agresiva⁸. Así, reúnen a las formas crónica y la agresiva de la enfermedad en una misma categoría y la caracteriza con un sistema de clasificación, que informa de la gravedad por estadios (Tabla 3) y grados (Tabla 4), en función del riesgo de progresión. De esta manera, la clasificación identifica tres formas de enfermedad (Tabla 1):

- EP necrosante.
- EP como manifestación de las enfermedades sistémicas.
- EP que debe de ser caracterizada adicionalmente, aplicando una clasificación mediante estadios y grados⁷.

Tabla 3. Clasificación de EP por estadios, según la gravedad del diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales.

	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
PIC en zona de mayor pérdida	1-2 mm	3-4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal < 15%	Tercio coronal 15-33%	Tercio medio	Tercio apical
Gravedad	Pérdidas dentarias periodontales	Sin pérdidas dentarias por razones periodontales	≤ 4 pérdidas dentarias por razones periodontales	≥ 5 pérdidas dentarias por razones periodontales
	PS máxima ≤4 mm	PS máxima ≤5 mm	PS ≥6 mm	PS ≥6 mm
Complejidad local	Pérdida ósea principalmente horizontal	Pérdida ósea principalmente horizontal	Además, complejidad Estadio II	Además, complejidad Estadio III
			Pérdida ósea vertical ≥ 3 mm	Trauma oclusal, movilidad dentaria ≥ 2
			Afectación de furca grados II o III	Colapso de mordida o abanicamiento dentario
			21-28 dientes residuales	< 20 dientes residuales
		Defecto de cresta moderado	Defecto de cresta grave	
Extensión	En cada estadio, describir la extensión como localizada (< 30 % de los dientes afectados), generalizada (>30% de los dientes afectados) o patrón molar/incisivo			

Nota. Adaptado de Tonetti y cols. (2018)⁷.

Tabla 4. Clasificación de EP por grados, basada en evidencia directa, evidencia indirecta y factores modificadores.

		Grado A	Grado B	Grado C
Evidencia Directa radiológica/clínica		No evidencia de pérdida de inserción/hueso	Pérdida <2mm.	Pérdida ≥ 2 mm.
Radiografías o evaluación periodontal en los 5 años anteriores	Pérdida vs. edad	< 0'25 %	0,25- 1,0	> 1,0
Evidencia indirecta	Fenotipo	Grandes depósitos de <i>biofilm</i> con bajos niveles de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de <i>biofilm</i>	destrucción superior a lo esperado teniendo en cuenta los depósitos de <i>biofilm</i>
Factores modificadores	Tabaquismo DM	No fumador No DM	< 10 cig. /día HbA1c < 7 con DM	≥ 10 cig. /día HbA1c ≥ 7 con DM

Nota. Adaptado de Tonetti y cols. (2018)⁷.

1.1.2 Etiología y patogenia de la enfermedad periodontal

1.1.2.1 Etiología infecciosa. El *biofilm*

Actualmente se considera que la flora bacteriana del surco gingival y sus productos metabólicos producen una reacción inflamatoria e inmunológica, con la finalidad de neutralizar la acción irritante y reparar los daños producidos por la agresión bacteriana^{9,10}. Pero esta respuesta del huésped puede ser perjudicial, acarreando mecanismos de hipersensibilidad con el resultado de un daño mayor. A su vez, estas bacterias se pueden diseminar, así como sus toxinas¹¹, estimulando procesos aterogénicos en las paredes arteriales, lo que se interpreta como un proceso defensivo del tejido conectivo de la pared arterial ante la agresión¹².

A pesar de la importancia de la placa en la génesis y perpetuación de la enfermedad, solo algunas personas desarrollan formas avanzadas de la misma, aunque la progresión es continua, con episodios de remisión localizada y posterior exacerbación^{13,14}. Por tanto, esta forma de evolución parece sugerir que el sistema inmunitario tiene un papel determinante en su génesis y cronicidad¹⁵.

Cuando la carga bacteriana de la placa subgingival, que funciona estructuralmente como un *biofilm*, aumenta, cuantitativa o cualitativamente, por el sobrecrecimiento de especies patógenas específicas, se va a producir un desequilibrio entre dicha carga bacteriana, los mecanismos de defensa locales y sistémicos del huésped. La consecuencia es la reducción de la respuesta inmunitaria, ya sea como consecuencia de la edad¹⁶, la herencia genética^{17,18} o de origen ambiental como, por ejemplo, el tabaco^{19,20}. De esta manera, se forma la bolsa periodontal, expresión clínica de la migración apical del epitelio de unión, destrucción de la unión conjuntiva y reabsorción del hueso alveolar básicamente mediante mecanismos inmunopatogénicos⁹.

Según Offenbacher (1996)²¹, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) constituyen la primera línea de defensa del huésped, de forma que la evolución quedará solo en una gingivitis. Si esta primera línea de defensa fracasa, se activa una segunda línea en la que participan linfocitos y monocitos, que van a liberar citocinas proinflamatorias, con la consiguiente destrucción tisular y formación de bolsas, que continuará hasta que el equilibrio entre la carga bacteriana y los mecanismos de defensa se restablezcan.

La flora bacteriana periodontal que forma un *biofilm* estructurado es fundamental en el desarrollo de la EP. Socransky y cols. (1998)¹³ analizaron 13.261 muestras de 185 pacientes, en el que se considera el estudio más importante realizado sobre la microbiología subgingival. Estos investigadores identificaron 40 especies que clasificaron en cinco grupos en función de la secuencia de colonización, así el grupo de *Actinomyces viscosus* son considerados como colonizadores tempranos.

En el *World Workshop* de la AAP de 1996 se dividieron los patógenos periodontales en tres grupos según el grado de asociación con la EP:

- Baja evidencia. *Eikenella corrodens*, bacilos entéricos, *Pseudomonas sp.*, *Selenomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, hongos.
- Moderada evidencia. *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola* y espiroquetas.
- Fuerte evidencia. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*.

Mombelli y cols. (2003)¹⁴ trataron de caracterizar la flora bacteriana periodontopatógena de las EP crónicas y agresivas, estudiando cinco patógenos periodontales: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, evidenciando que la variante leucocitotóxica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es la única asociada con la EP agresiva, aunque no se detecta en la mayoría de los pacientes diagnosticados. Por tanto, la presencia o la ausencia de alguno de estos patógenos no es concluyente para establecer un diagnóstico¹⁴.

El biofilm

Durante el siglo pasado, la atención de los médicos se centró en las infecciones agudas causadas por bacterias con mecanismos concretos de patogenicidad, tales como la tosferina o el tétanos. En la actualidad, el interés se dirige hacia las infecciones crónicas con pobre respuesta a los antibióticos y que por ahora no pueden prevenirse por inmunización. Ejemplos de estas infecciones son las relacionadas con la colonización bacteriana de la superficie de implantes médicos, infecciones urinarias crónicas o la EP. El estudio de estas superficies infectadas muestra claramente que las bacterias responsables crecen adheridas sobre los implantes o los tejidos, produciendo *biofilms*.

Los *biofilms* se definen como “comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o de tejido vivo”²². Son ejemplos de *biofilm*, el material mucoso que cubre las piedras de los lechos de los ríos o la placa dental²². La capacidad de formación de *biofilms* no parece estar limitada a unos microorganismos concretos, considerándose actualmente que, en determinadas condiciones, cualquier microorganismo es capaz de formarlos.

Una de las cuestiones fundamentales que surge al estudiar la estructura de un *biofilm*, es cómo las bacterias del interior tienen acceso a los nutrientes. Estudios con microscopía han demostrado que la matriz no es sólida, sino que presentan canales que permiten el flujo de agua y oxígeno hasta las capas más profundas. No obstante, dentro del *biofilm*, las distintas concentraciones de nutrientes, pH y oxígeno son diferentes, lo que condiciona la clase de nicho ecológico y, por tanto, el tipo de microorganismo²³.

1.1.2.2 Respuesta inmune

Ebersole y cols. (1985)²⁴ demostraron que los enfermos con EP presentan anticuerpos séricos frente a bacterias periodontales, evidenciando así que la respuesta inmune del huésped puede estar estrechamente asociada con la enfermedad. Por lo tanto, la distinta intensidad de la respuesta inmune frente a los patógenos periodontales determina la aparición del cuadro clínico, independientemente de la composición cuantitativa o cualitativa de la placa^{25,26}. A su vez, esta respuesta está condicionada por factores tanto genéticos como ambientales.

La primera barrera frente a la penetración bacteriana es la respuesta inmune inespecífica. De esta manera, los PMN son capaces de delimitar la lesión en forma de una gingivitis¹⁴. Los lipopolisacáridos (LPS) de las paredes bacterianas son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato, denominados *Toll-like* (TLR), promoviendo la síntesis de citocinas proinflamatorias por parte de los PMN y los macrófagos²⁷, con la consiguiente destrucción de los tejidos periodontales, estableciendo así la cronicidad característica de la EP¹⁴.

En esta situación de cronicidad, es determinante la activación del sistema inmune adaptativo, situación que requiere el procesado del antígeno por parte de los macrófagos y su presentación a los linfocitos T colaboradores (Th) Th0 naive²⁸, que liberan citocinas inflamatorias, interleucinas (IL) IL-4, IL-17 e interferón gamma (IFN- γ^+), amplificando a su vez la respuesta inflamatoria con la activación de los linfocitos T-citotóxicos y células plasmáticas.

Por otra parte, la interacción de las células mediadoras del proceso inflamatorio y de las citocinas proinflamatorias con el tejido conectivo del periodonto da lugar a la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), del factor nuclear kappa beta ligando (RANKL), metaloproteinasas (MMP) MMP-1 y MMP-3, entre otras, estimulando la diferenciación en osteoclastos, destruyendo el tejido óseo y conectivo con la consiguiente destrucción de las estructuras periodontales²⁷. A nivel sistémico, las citocinas inflamatorias generadas van a promover la síntesis hepática de reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno, dando lugar a un estado inflamatorio crónico sistémico inespecífico, también conocido como “inflamación sistémica de bajo grado”²⁹.

Más recientemente, se ha propuesto el llamado modelo de sinergia polimicrobiana disbiótica, y se ha sugerido que las bacterias asociadas con la EP son capaces de sobrevivir en un ambiente inflamatorio, el cual es fuente de nutrientes dada la degradación de los tejidos. De esta manera, se crea un círculo vicioso en el que la inflamación aumenta la carga bacteriana y la disbiosis, dando lugar a un estado que se conoce como inflamofilia²⁸.

1.1.2.3 Factores genéticos

Van der Velden y cols. (1993)³⁰ pusieron de manifiesto la relación de la EP entre individuos pertenecientes a una misma familia, y posteriormente, Michalowicz y cols. (1999)³¹ afirmaron que la enfermedad crónica tiene el 50% de probabilidades de ser heredada, excluyendo sesgos medioambientales como el tabaco. De esta manera, el tipo de herencia para un carácter ya sea homocigótico o heterocigótico, junto a la interacción

con los distintos factores de riesgo del medio ambiente, que actúan como modificadores, serán determinantes para que se desarrolle o no la enfermedad.

EP agresivas

En las EP prepuberales, la herencia puede ser autosómica recesiva o dominante³². De la interacción entre genética, factores bacterianos periodontopatógenos, y ambientales, depende el binomio salud/enfermedad del periodonto³³. Por ello, las EP agresivas son sistémicas y aparecen en personas con enfermedades hereditarias³⁴.

EP crónicas

Los estudios sugieren que el papel de la herencia, en el caso de las enfermedades crónicas, no está demostrada³⁴. Así, la identificación de los factores hereditarios se refiere específicamente a las EP agresivas en pacientes sin enfermedades sistémicas.

Polimorfismos genéticos

La presencia de polimorfismos genéticos, es decir, de caracteres controlados por múltiples alelos de un mismo gen, están presentes en el 1% de la población y originan múltiples fenotipos. Algunos estudios, como el realizado por Babel y cols. (2006)³⁵, indican que los polimorfismos genéticos pueden ser los responsables de la variabilidad en la secreción del factor de crecimiento transformador beta (TGF β) e IL-6, que favorecería la susceptibilidad a padecer EP crónica. En concreto, el polimorfismo genético de la IL-1 (IL-1/IL-1) se ha asociado a un 30% de los adultos con EP agresivas, como pusieron de manifiesto Kornman y cols. (1998)³⁶ (Figura 1).

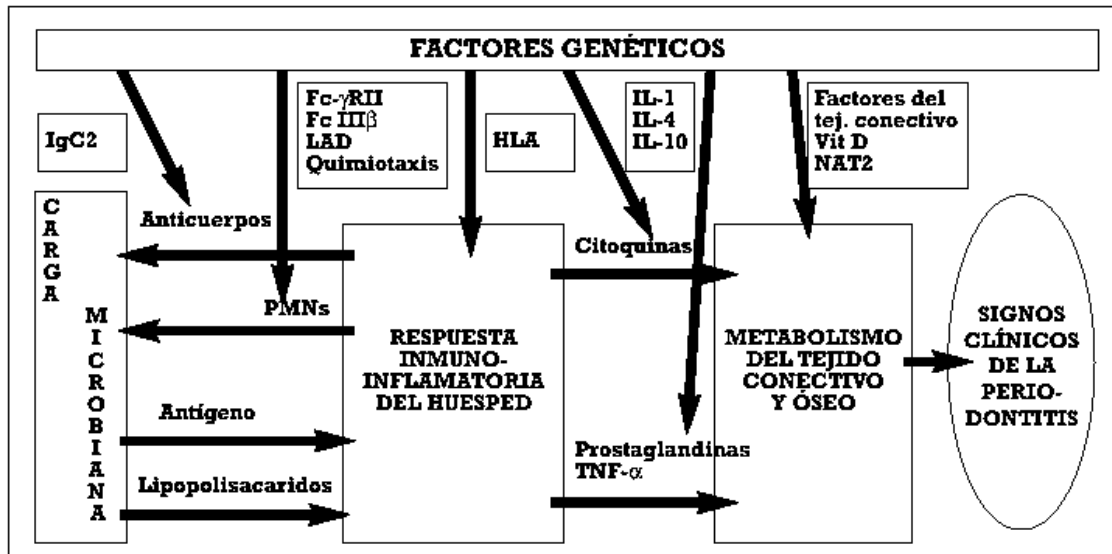


Figura 1. Esquema de Hart y Kornman, sobre la influencia de determinados factores genéticos en la EP.

Nota. Tomado de Hart y cols. (1997)¹⁸.

Se ha sugerido que determinados polimorfismos genéticos se asocian con niveles elevados de factor de necrosis tumoral (TNF) y PGE₂, que son inducidos por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos o factores de crecimiento, que han sido identificados tanto en las formas crónicas como en las agresivas^{37,38}. Igualmente, se han observado polimorfismos genéticos en la IL-1 y el TNF, que son potentes estimuladores de la reabsorción ósea, en la IL-4,³⁹ que regula la función de los macrófagos, y en la IL-10⁴⁰, que se ha asociado tanto con las formas crónicas como con las agresivas^{41,42}. Los polimorfismos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), han sido también asociados con la EP juvenil. Son moléculas que están presentes en todas las células nucleadas del organismo, e intervienen en la respuesta inmunitaria presentando el antígeno a las células T⁴³.

Se han encontrado relaciones de los antígenos HLA-A9, HLA-A28, HLA-Bw15, HLA-Bw35 y HLA-DQw1 con las formas agresivas, y entre los antígenos HLA-A9, HLA-A28 con las crónicas. Por otro lado, los antígenos HLA-A9 y HLA-B15 se han asociado a formas localizadas de EP juvenil⁴⁴⁻⁴⁷. Además, los polimorfismos de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) y del gen del receptor de la vitamina D, se asocian también con una pérdida más severa de hueso alveolar⁴⁸.

1.1.2.4 Factores ambientales y de perfil

Entre los factores etiológicos ambientales modificables, se pueden enunciar el tabaco, la diabetes, el estrés, la higiene oral deficiente y la obesidad, entre otros. Existen múltiples publicaciones sobre el papel que desempeña el tabaco en el desarrollo de la EP crónica, que indican que los fumadores tienen bolsas más profundas y de localización lingual que los sujetos no fumadores^{19,20}. Se han observado alteraciones en la función de los PMN y una disminución de los linfocitos *T-helper* (Th)¹⁹, importantes para la producción de anticuerpos, con niveles reducidos de inmunoglobulinas (Ig), IgA salivar, IgG sérica, en concreto frente a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. La nicotina aumenta la producción de IL-6 e IL-8 por los neutrófilos del ligamento periodontal y es capaz de seleccionar un grupo específico de patógenos formado por: *Bacteroides Forsythus*, *Peptostreptococcus Micros*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Campylobacter Rectus*.

La relación entre la DM y la EP es bidireccional. Así, una DM mal controlada aumenta el riesgo de padecer la enfermedad y, a su vez, una EP no tratada empeora el control de la DM. Entraría dentro de los factores de riesgo modificables, ya que existe suficiente evidencia de que los sujetos diabéticos presentan mayor incidencia que los no diabéticos y que, además, esta es más severa, aunque de extensión similar a la de los no diabéticos^{49,50}.

Por otro lado, Heckmann y cols. (2006)⁵¹ establecen una asociación entre estrés emocional y depresión con la EP, evidenciando una mayor pérdida ósea y de inserción. Las razones pueden ser tanto una respuesta inadecuada del sistema inmune, como un mayor tabaquismo y menor control de placa¹².

Además, está totalmente demostrada la relación de los hábitos higiénicos y el control de placa, con el desarrollo de la EP¹⁶. En cuanto a los factores antropométricos, la obesidad implica la existencia de un estado inflamatorio sistémico derivado de un aumento de citocinas inflamatorias, como las IL-6 y IL-1, que van a afectar al endotelio vascular, produciendo disfunción endotelial y síndrome metabólico^{52,53}.

Ciertos factores parecen influir de forma distinta según los grupos de población. Así, se citan también el estatus socioeconómico bajo, la edad avanzada, la maloclusión, el trauma oclusal, infección por VIH, el sexo masculino, la raza negra y la osteopenia⁵⁴⁻⁵⁶.

1.1.3 Epidemiología de la enfermedad periodontal

Históricamente, Black en 1918 puso de manifiesto la pérdida de hueso alveolar y, por lo tanto, la presencia de EP en el 13% de los sujetos entre 20 y 24 años, del 68% entre los 30 y 39 años, y el 88% en los mayores de 50 años⁵⁷. Baume y cols. (1975)⁵⁸, Anerud y cols. (1979)⁵⁹ informan en sus estudios que las EP son más destructivas cuando se inician en jóvenes que cuando lo hacen en adultos. Bawen y cols. (1985)⁶⁰, indican que encuentran más afectación periodontal en varones de raza negra, seguido de las mujeres negras y varones blancos y, en menor grado, en mujeres de raza blanca. Los trabajos que efectuaron Page y cols. (1982)⁶¹ determinaron que, a los 40 años, más del 50% de los pacientes tienen formas crónicas de presentación. Sin embargo, debido al cambio de nomenclatura llevada a cabo por el *World Workshop* de la AAP-EFP en 2018³, existen pocos estudios epidemiológicos sobre la base de los nuevos criterios y la prevalencia de la EP crónica.

Por otro lado, la prevalencia de la EP, no se distribuye de forma uniforme entre las diferentes etnias y grupos socioeconómicos, cambiando en función de la población objeto de estudio. Así, en Europa, sólo un 10% de los sujetos presentan formas severas con bolsas mayores de 5,5 mm. Además, desde 1976 se evidencia una disminución de las lesiones con bolsas mayores de 4 mm. El 13% de los europeos entre 35-44 años tienen formas de presentación moderadas, con bolsas de 3,5 mm⁶².

En España, basándose en los criterios unificados de la Organización Mundial de la Salud, el Consejo General de Dentistas realiza encuestas cada quinquenio desde 1995. Según los datos de la encuesta de salud oral España 2020, en el grupo de 35-44 años, el porcentaje de sujetos con bolsas ≥ 6 mm, y de 4-5 mm, tomó un valor de 7,6% y 11,6%; en la cohorte de 65-74 años fue de 17,9% y 22,9%, respectivamente⁶³.

Estudios trasversales indican que la EP, en su forma severa, afecta minoritariamente a sujetos de países industrializados, aumenta con la edad y tiene un pico entre los 50-60 años. En resumen, según Irfan y cols. (2010)⁶⁴, Gamonal y cols. (2001)⁶⁵, la forma más frecuente es predominante en personas mayores, de clínica leve y de evolución crónica.

1.1.4 Tratamiento no quirúrgico de la enfermedad periodontal

A grandes rasgos, el tratamiento de la EP está orientado, por una parte, a limitar la progresión de la enfermedad controlando tanto la infección como los factores de riesgo y como consecuencia la respuesta inflamatoria, y, por otra parte, a regenerar las estructuras periodontales lesionadas⁶⁶. Ranfjord en (1993)⁶⁷ estructuró el tratamiento en cuatro fases:

- Fase sistémica. Incluye el control de las enfermedades sistémicas que pudieran estar involucradas en la patogenia; como la diabetes, medicaciones que provoquen alteraciones gingivales como los calcioantagonistas dihidropiridínicos, anticonvulsivantes como las hidantoínas, hábitos deletéreos como el tabaco, o situacionales como el estrés⁶⁶.
- Fase higiénica. A su vez, se puede dividir en varias etapas, abarcando desde la eliminación de la placa y el cálculo de las superficies radiculares, así como los márgenes de restauraciones sobrecontorneadas, hasta la instrucción del paciente en las técnicas de higiene oral (profilaxis supragingival)^{68,69}, raspado y alisado radicular (RAR)^{70,71}, detoxificación de la superficie radicular mediante distintos procedimientos que pueden ser tanto físicos, como utilización de luz láser, como químicos, mediante el uso de ácido cítrico, ozono o antisépticos como la clorhexidina⁷²⁻⁷⁵. En el presente estudio, se trató a los pacientes mediante una sola sesión o *full-mouth*, que ha demostrado beneficios sobre el tratamiento clásico realizado por cuadrantes⁷⁶.

- Fase correctiva. Incluye todos los procedimientos dirigidos a minimizar las consecuencias de la destrucción de las estructuras periodontales, desde la prescripción de férulas de descarga oclusal, hasta los procedimientos quirúrgicos para la regeneración ósea o la colocación de implantes dentales⁶⁶.
- Fase de mantenimiento. Tiene por objeto el mantenimiento de la salud periodontal conseguida en las fases previas, motivando e instruyendo al paciente en las distintas técnicas de control de placa. En esta fase se establecen visitas de mantenimiento cada 3-4 meses, eliminando la placa y el cálculo, variando su frecuencia en función de la evolución⁶⁷.

Tras el tratamiento periodontal no quirúrgico, tendrá lugar una reorganización de los tejidos epitelial y conectivo, formándose una nueva inserción, pero no regeneración de la unión epitelial, que formará el denominado “epitelio largo de unión”⁷⁷.

1.1.4.1 La doxiciclina tópica como medicación adyuvante

Los antibióticos tópicos se emplean en periodoncia con el objeto de eliminar más eficazmente los gérmenes de la placa subgingival, ya que se introducen directamente en las bolsas periodontales minimizando los efectos adversos sistémicos, abarcan básicamente, a todo el grupo de las tetraciclinas⁷⁸, ya que prácticamente todos los patógenos periodontales son sensibles, fundamentalmente a la doxiciclina y la minociclina⁷⁹.

Las tetraciclinas constituyen un grupo de agentes de amplio espectro, eficaces contra muchas especies gramnegativas y grampositivas, y que actúan inhibiendo la síntesis proteica, por lo tanto, son bacteriostáticas. La doxiciclina y la minociclina son, hoy en día, las más usadas en periodoncia⁷⁸, tienen otras propiedades además de la actividad antibacteriana y que aumentan los beneficios de su utilización, entre las que destaca su acción antiinflamatoria, la inhibición de las colagenasas, de la reabsorción ósea y el incremento de la afinidad de los fibroblastos por la superficie radicular⁷⁹.

En las décadas de 1960 y 1970, dada la importancia del *biofilm* como película microbiana, la EP se trató como una enfermedad infecciosa. Posteriormente, en la década de 1980, la identificación de los mecanismos de respuesta del huésped se consideraron los mediadores de la destrucción del periodonto rico en colágeno, y los microorganismos periodontopatógenos se consideraban como el elemento desencadenante. Más recientemente, ha surgido una nueva estrategia farmacológica, denominada "terapia de modulación del huésped", basada, por un lado, en la propiedad de antibióticos, como las tetraciclinas, para impedir la degradación del colágeno dada su capacidad para inhibir las MMP; y por otro, en las acciones de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como el flurbiprofeno, formulaciones de tetraciclinas tetrafenólicas químicamente modificadas sin acción antimicrobiana, en particular la tetraciclina 3, y las curcuminas bifenoólicas químicamente modificadas, para reducir la gravedad de la enfermedad^{80,81}.

En el presente estudio, se utilizó doxiciclina hiclato bajo la forma farmacéutica de gel periodontal precargado en cartuchos con 140 mg, conteniendo cada uno 36,40 mg de doxiciclina, comercializado bajo el nombre de Ligosan®. Los preparados de aplicación local minimizan la exposición sistémica, disminuyendo de esta forma los posibles efectos secundarios y solo se aplican una vez, liberándose lentamente a lo largo de 12 días. Su utilización se recomienda para profundidades de bolsa ≥ 5 mm⁸²⁻⁸⁶. Clínicamente, se evidencia una disminución de la PS y una ganancia del nivel de inserción, cuando se compara con el tratamiento únicamente con RAR⁸⁷.

1.2 ASOCIACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LAS ENFERMEDADES SISTÉMICAS

La asociación entre las infecciones orales y los desórdenes sistémicos ya fue planteada en el siglo VII antes de Cristo⁸⁸, más tarde en el siglo XVIII, Benjamín Rush⁸⁸ publicó que la artritis podía ser tratada extrayendo las piezas dentales en mal estado, y William Hunter en 1910⁸⁸ describe infecciones cerebrales, pulmonares y cardíacas con origen en dientes infectados⁸⁹. Beck y cols. (1998)⁹⁰, entre otros, plantean que las infecciones orales pueden estar asociadas a procesos de morbilidad general y cardiovascular en particular⁹⁰. Actualmente, la extensa bibliografía acerca de la relación entre EP como factor de riesgo potencial sobre diversos órganos y sistemas⁹¹, ha dado lugar a que algunos autores, como Offenbacher (1996)²¹, propongan el nacimiento de una nueva disciplina, la “medicina periodontal”, especialidad que tiene por objeto el estudio de la relación existente entre las patologías periodontales y las enfermedades sistémicas.

La EP supone una agresión inflamatoria continua por la gran superficie de epitelio afectado en las bolsas, y que, a través de distintos mecanismos, es capaz de diseminar elementos patógenos por el organismo⁹², tales como infección metastásica por microorganismos, daño metastásico por endotoxinas, inflamación metastásica por la liberación de citocinas inflamatorias o procesos autoinmunes frente a antígenos bacterianos (*Porphyromonas gingivalis*).

Sanz y cols. (2001)⁸⁹, Beck y cols. (1998)⁹⁰, Hidalgo (2001)⁹¹, Mealey y cols. (2004)⁹², entre otros, plantean un modelo por el cual la EP es capaz de promover la síntesis hepática de PCR, fibrinógeno y diversas moléculas de adhesión intercelular (ICAM), dando lugar a un estado proinflamatorio sistémico. Sin embargo, la gran cantidad de factores de confusión existentes, dado que las infecciones bucales son solo uno de los muchos factores que pueden influir en las enfermedades sistémicas, hace difícil establecer una relación causa efecto definida.

Aproximadamente el 14% de la población padece DM, de la cual el 87% son DM2. La relación entre la DM y la EP es bidireccional. Así, la DM no controlada se asocia con una mayor afectación periodontal^{21,93-97,98-105} y, a su vez, una EP no tratada conduce a un peor control glucémico, con independencia de que sean o no diabéticos. Así, el tratamiento de la enfermedad consigue una reducción media del 0,36% en las cifras de hemoglobina glicosilada (HbA1c) e, incluso, existen evidencias de que enfermos con formas avanzadas presentan un mayor riesgo de desarrollar DM^{106,107}.

Existen varios estudios clásicos que evalúan el papel del tratamiento periodontal en el control metabólico de la DM. William y cols. (1960)⁹⁷, observaron que reducían las necesidades de insulina en más de un 50%. Miller y cols. (1993)¹⁰⁶, evaluaron el efecto de la doxiciclina sistémica durante 14 días, más terapia periodontal no quirúrgica, sobre el control glucémico, destacando que la reducción del sangrado al sondaje se acompañaba de una disminución significativa de los niveles de HbA1c. Cuatro años después, Grossi y cols.¹⁰⁸ combinan el tratamiento periodontal no quirúrgico con doxiciclina sistémica 100 mg/día, durante 14 días, observando que se redujeron las necesidades de insulina.

Se ha publicado que el 18% de los nacimientos de bajo peso serían atribuibles también a la EP¹⁰⁹. Existen evidencias de la asociación con el parto prematuro y el bajo peso al nacimiento^{110,111}. Por otra parte, Noack y cols. (2005)¹¹², concluyen que, aunque existe una tendencia a la asociación, esta no siempre es estadísticamente significativa. Así, la enfermedad supone la infección de los tejidos periodontales, y esta situación supone un incremento en los niveles circulantes de prostaglandinas, citocinas proinflamatorias, así como de PCR^{113,114}, que explican la citada asociación, dado que comprometen la integridad estructural y funcional de la placenta¹¹⁵.

1.2.1 Evidencias de asociación entre la enfermedad periodontal y riesgo cardiovascular

Saikku y cols. (1998)¹¹⁶ publicaron los primeros artículos en los que se pone de manifiesto el vínculo existente entre las infecciones bacterianas y las coronariopatías. Patel y cols. (1995)¹¹⁷ relaciona las infecciones virales crónicas por citomegalovirus y herpesvirus. La EP y los procesos arterioscleróticos aparecen relacionados en los trabajos realizados por Beck y cols. (1998)⁹⁰, por Gostman y cols. (2007)¹¹⁸, entre otros. Iwai (2009)¹¹⁹ indica que las EP producen bacteriemias, que se manifiestan en un incremento de los diversos marcadores inflamatorios. Noack (2005)¹¹² observó bacteriemias tras el raspado y alisado radicular dentro del tratamiento periodontal no quirúrgico y después de extracciones dentales e incluso tras el cepillado dental según los trabajos de Forner y cols. (2006)¹²⁰.

El estudio anatomopatológico de lesiones ateromatosas ha demostrado la presencia de bacterias periodontales como señalan en sus estudios Padilla y cols. (2006)¹²¹ y Pucar y cols. (2007)¹²². Igualmente, pueden penetrar el endotelio vascular invadiendo las células de la capa muscular lisa, según las observaciones de Deshpande y cols. (1998)¹²³ y Dom y cols. (1999)¹²⁴.

Diversos estudios han puesto de manifiesto cómo las formas severas se asocian a una mayor extensión de las lesiones ateromatosas, a una mayor profundidad de las bolsas periodontales, a elevadas concentraciones plasmáticas de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y, por consiguiente, a mayor aterogénesis. Khovidhunkit y cols. (2000)¹²⁵, afirman que esta elevación de las VLDL neutralizaría el efecto proinflamatorio de los LPS bacterianos al unirse a ellos. Mustapha y cols. (2007)¹²⁶ demuestran que la elevación de anticuerpos frente a patógenos periodontales se asocia a un riesgo aumentado de infarto de miocardio. Otros autores, como Desvarieux y cols. (2005)¹²⁷ y Beck y cols. (2005)¹²⁸, miden mediante ecografía el grosor de la pared aórtica y la relacionan con la carga bacteriana, obteniendo resultados con significación estadística.

Buhlin y cols. (2009)¹²⁹, Gani y cols. (2009)¹³⁰, Nakajima y cols. (2010)¹³¹ demuestran que la EP se asocia con niveles elevados de marcadores como la PCR y la IL-6. Yoshii y cols. (2009)¹³² indican que estos niveles no preceden a la enfermedad, sino que se elevan con ella. D' Aiuto y cols. (2005)¹³³ y Vidal y cols. (2009)¹³⁴ observan una reducción significativa de los marcadores inflamatorios tras el tratamiento periodontal, incluso de biomarcadores como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), molécula de citoadhesión vascular 1 (VCAM-1) y MMP-9. Behle y cols. (2009)¹³⁵ mencionan la heterogeneidad de resultados tras el tratamiento con respecto a la respuesta en los diversos biomarcadores, en línea con los estudios de Blake y cols. (2001)¹³⁶ y Ridker y cols. (2000)¹³⁷, que estudian la PCR medida en rango ultrasensible o (PCRus) como un predictor de riesgo cardiovascular, y de Tonetti y cols. (2007)¹³⁸, que demuestran una mejoría de la DE después del tratamiento periodontal.

Todos los estudios e investigaciones anteriores pueden interpretarse como un nexo de relación entre la EP y la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa

1.2.2 Mecanismos de asociación entre la enfermedad periodontal y el riesgo cardiovascular

Hasta los años 70 del siglo pasado se pensaba que la hipercolesterolemia por sí sola era capaz de dañar el endotelio y provocar arterioesclerosis, como publicaban Ross y cols. (1973)¹³⁹. Estudios posteriores aportaron el concepto de un núcleo lipídico rodeado de células musculares lisas, que proliferaban bajo la acción de factores de crecimiento. En los años 90 surge la inflamación como factor fundamental en el desarrollo del proceso ateromatoso, como publicaron Fuste y cols. (1992)¹⁴⁰ y Libby (2002)¹⁴¹.

En condiciones de normalidad, las células endoteliales producen sustancias vasoactivas como el óxido nítrico y la PGE₁, con propiedades antiadherentes y antitrombóticas. Una alteración homeostática, provocada por un proceso inflamatorio o una dislipemia, producirá un daño en las células endoteliales, que sobreexpresarán moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), VCAM-1¹⁴², E-Selectina

y P-Selectina. Según los trabajos de Johnson y cols. (1997)¹⁴³, la VCAM-1 facilita la adhesión de monocitos y linfocitos T.

Los estudios de Skålen y cols. (2002)¹⁴⁴, Leitengen y cols. (2003)¹⁴⁵ indican que, en los pacientes dislipémicos, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) infiltrarán la pared arterial, que serán modificadas por oxidación, provocando la formación de fosfolípidos que activarán el factor de transcripción nuclear kappa beta (NF- κ B), que a su vez activa el gen de la VCAM-1 en la célula endotelial¹⁴⁶. Por un mecanismo similar, se sintetizan otras citocinas como la IL-1 β y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α).

Las células musculares lisas vasculares de la pared arterial sometida a estrés mecánico producen proteoglicanos, y estos retienen lipoproteínas que se oxidarán, promoviendo así el proceso inflamatorio¹⁴⁷. De ahí que las lesiones se produzcan preferentemente en las bifurcaciones arteriales, donde el flujo deja de ser laminar, al superar la velocidad del fluido el número de Reynolds. Igualmente, las plaquetas activarán las células endoteliales al adherirse a su superficie, de ahí que su inhibición reduzca el infiltrado leucocitario¹⁴⁸. Tras la colonización del tejido conectivo, los patógenos periodontales ocasionan en el huésped una respuesta inflamatoria, con la liberación de citocinas, IL-1, IL-6, TNF α , MMP y PGE₂, que van a difundir a nivel sistémico afectando el endotelio vascular y promoviendo la síntesis hepática de reactantes de fase aguda, como el fibrinógeno y la PCR, con el resultado de un estado inflamatorio generalizado de bajo grado.

Los estudios de Chou y cols. (2005)¹⁴⁹ indican que las cepas invasivas de *Porphyromonas Gingivalis*, es decir, las que poseen fimbrias, son capaces de activar genes que codifican citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y la ciclooxigenasa tipo 2, así como producir efectos procoagulantes. Otros mecanismos incluyen la oxidación de las LDL, efecto no observado en las especies no invasivas de *Porphyromonas Gingivalis*. Como publican Bengtsson y cols. en 2008¹⁵⁰, la sobreexpresión de la proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (MCP-1)^{151,152} y la disminución de la producción de óxido nítrico por parte de las células endoteliales *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* aumenta la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 en las células del endotelio. Como indican Zhang

y cols. (2001)¹⁵³, en última instancia esto inducirá la liberación de MMP-9 y especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los macrófagos. Este proceso aumenta la aterogénesis y la inestabilidad de la placa, al degradar la matriz de colágeno¹⁵⁴. Por otra parte, los estudios de Khovidhunkiten y cols. (2004)¹⁵⁵ indican que los pacientes con EP presentan una elevación de las VLDL como parte de la respuesta inmunitaria innata, ya que estas lipoproteínas neutralizan el efecto tóxico de los mucopolisacáridos de las cápsulas bacterianas, pero, a largo plazo, esta elevación resulta ser un factor proaterogénico.

Todas estas observaciones ponen de manifiesto que la EP es un factor de riesgo para el desarrollo de arterioesclerosis en general, y de eventos cardiovasculares en particular, publicados por Cueto y cols. (2005)¹⁵⁶. Igualmente, se ha evidenciado que el tratamiento de la EP mejora los distintos biomarcadores inflamatorios. No obstante, y debido a los factores de confusión coexistentes dada la naturaleza multifactorial de la aterogénesis, no existen todavía conclusiones firmes sobre el grado de implicación de la enfermedad en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad cardiovascular.

1.2.2.1 Evaluación de la inflamación sistémica y del estrés oxidativo en la enfermedad periodontal

Los procesos inflamatorios, ya sean agudos o crónicos, van a producir cambios en la concentración de ciertas proteínas plasmáticas y alteraciones metabólicas, horas después del estímulo¹⁵⁷. Se denominan proteínas de fase aguda a aquellas cuya concentración plasmática aumenta o disminuye, como es el caso de la transferrina y de la albúmina, como mínimo un 25% durante el proceso. Estos cambios también se asocian a los procesos inflamatorios crónicos^{158,159}. Estas proteínas de fase aguda son producidas por el hígado tras el estímulo de citocinas inflamatorias sintetizadas por las células endoteliales, monocitos y macrófagos activados, y que implica también a otros órganos y sistemas como el sistema nervioso central o la médula ósea¹⁶⁰.

Cuando se trata de determinar concentraciones séricas de PCR menores de 1 mg/dl, con objeto de distinguir niveles basales, de pequeños incrementos debidos a procesos

inflamatorios crónicos subclínicos y también en la valoración del riesgo cardiovascular¹⁶¹, se utiliza el método de determinación de la PCRus. Así, según el nivel sérico, el riesgo cardiovascular se clasifica en riesgo relativo bajo <0,1 mg/dl; medio entre 0,1 y 0,3 mg/dl; y alto >0,3 mg/dl^{156,162,163}. La PCR es un marcador inespecífico de inflamación, un predictor de enfermedad coronaria y enfermedad vascular subclínica. Existen evidencias que muestran un incremento del riesgo de infarto de miocardio y enfermedad cerebrovascular cuando existen pequeños incrementos séricos de PCR¹⁶².

Los criterios de riesgo clásicos de Framingham¹⁶⁴, como la edad, el tabaquismo, dislipemia, DM e hipertensión arterial, resultan claramente insuficientes como predictores de riesgo, puesto que hasta el 20% de los eventos coronarios se producen en ausencia de estos factores de riesgo clásicos^{165,166}. Igualmente, hay pacientes que nunca desarrollarán la enfermedad¹⁶⁴. Por tanto, es necesario incorporar nuevos marcadores, como los niveles de triglicéridos, de fibrinógeno o de homocisteína, con objeto de mejorar la sensibilidad en la predicción de futuros eventos cardiovasculares, sobre todo en los grupos con mayor incertidumbre, como son los de riesgo bajo e intermedios^{161,167}, que son los grupos donde se concentran la mayoría de los eventos cardiovasculares. Es en estos grupos, donde la incorporación de la determinación de la PCRus puede tener mayor utilidad en la toma de medidas preventivas, al ayudar a reclasificar el riesgo y contribuyendo así a la mejora de la predicción^{158,161,168}.

Relación entre la EP y los niveles séricos de PCRus

Uno de los campos de investigación en periodoncia incluye el estudio de la relación existente entre la EP y la enfermedad vascular arterioesclerótica¹⁶⁹. Los mecanismos básicos propuestos para explicar dicha asociación han sido o bien por la infección crónica que supone el paso de microorganismos y toxinas a la circulación general, o bien por los mediadores originados por el proceso inflamatorio que originan la arterioesclerosis^{170,171}.

La PCR puede considerarse un importante marcador inflamatorio, que se encuentra alterado tanto en procesos inflamatorios agudos como crónicos¹⁷². En la EP, la invasión de las estructuras periodontales por los microorganismos hará que los LPS bacterianos

estimulen la producción de factores como la IL-6 y el TNF α , que, a su vez, estimularán las células hepáticas promoviendo la síntesis de PCR^{173,174}.

En un estudio de Ebersole y cols. (1977)¹⁷² y Elter y cols. (2006)¹⁷⁵ se demostró que los enfermos periodontales presentan un aumento de los niveles séricos de la PCRus si se los compara con un grupo libre de la enfermedad. Matilla y cols. (2002)¹⁷⁶, por el contrario, sólo encuentran elevaciones en los niveles de PCRus en algunos individuos. Slade y cols. (2000)¹⁷⁷ observaron que individuos con EP presentaban los mismos niveles de PCRus que individuos edéntulos, de forma que a la naturaleza multifactorial de los procesos capaces de alterar los niveles séricos de PCRus, se unirá una variabilidad individual que condicionará los resultados^{171,175,178}.

La evolución a brotes de la EP, con periodos de remisión seguidos de otros de actividad, sugiere que niveles séricos PCRus mayores de 0,3 mg/dl indican periodos de agudización con gran actividad inflamatoria, mientras que niveles por debajo de 0,1 mg/dl sugieren procesos de remisión. Igualmente, niveles mayores de 0,3 mg/ml definen, al mismo tiempo, a los individuos con alto riesgo cardiovascular¹⁶¹. D' Aiuto y cols. (2004)¹⁶¹ evalúan el efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico sobre los niveles séricos de PCRus y, observan que, antes del tratamiento los niveles eran suficientemente elevados como para ser considerados medios altos, después del tratamiento estos niveles se reducían y, con ellos, el riesgo cardiovascular.

Por lo que respecta al impacto de los factores de confusión sobre los niveles séricos de PCRus, puede destacarse que se elevan con la edad debido al incremento de la grasa corporal, el sedentarismo y el aumento de patologías crónicas subclínicas que tienen componentes inflamatorios¹⁷⁴. Además, los niveles séricos de PCRus tienden a ser mayores en el sexo femenino¹⁷¹.

No está suficientemente aclarado el papel que desempeña la PCR como factor de relación entre la EP y las enfermedades cardiovasculares, ya que son necesarios más estudios para determinar el papel que desempeña el tratamiento en la reducción de la incidencia y la progresión de la enfermedad cardiovascular arterioesclerótica.

Relación entre la EP y los niveles séricos de fibrinógeno

El fibrinógeno es una glicoproteína cuya estructura está formada por tres cadenas polipeptídicas, tiene un peso molecular de 340 kilodalton, una vida media de 3 a 6 días y sus niveles plasmáticos oscilan entre 150 y 450 mg/dl¹⁷⁹. Ante un proceso inflamatorio, aumentará su valor entre 2 y 20 veces, permaneciendo elevados durante 3 a 5 días después de remitir el proceso¹⁸⁰.

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno se aceptan como medida de la inflamación sistémica. Kweider y cols. (1993)¹⁸¹ compararon casos control con otros con EP, en los que puso de manifiesto la elevación de los niveles de fibrinógeno en los enfermos periodontales en comparación con los individuos control.

Relación entre la EP, el estrés oxidativo y los niveles séricos de malondialdehído (MDA) y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

Los PMN, como células fundamentales de la respuesta inmune innata, generan citocinas proinflamatorias, MMP y ROS, que juegan un papel fundamental en el establecimiento y progresión del daño periodontal^{182,183}. Estos mecanismos, básicamente defensivos, se convertirán en una agresión para los tejidos periodontales como consecuencia de la producción de radicales libres ROS, que incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los ROS son moléculas que tienen un electrón de valencia no apareado, y por lo tanto son extremadamente reactivas, de manera que cuando reaccionan con una molécula, especialmente el radical OH^- , restan un H^+ , oxidándolo. Si estas moléculas son los ácidos grasos de las membranas lipídicas celulares, se transforman en radicales de ácidos grasos que, a su vez, tendrán la capacidad de oxidar otra molécula de ácido graso. Este fenómeno se conoce como peroxidación lipídica (LPO), y durante el mismo se producen aldehídos altamente tóxicos^{182,184} como el MDA, que puede utilizarse como un indicador de daño tisular. Por tanto, las concentraciones séricas de MDA y 8-OHdG están aumentadas en pacientes con EP, como expresión de un mayor estrés oxidativo en la etiología de las lesiones y su cuantificación, en consecuencia, permitirá valorar el estado prooxidante.

Otra molécula dañada por los ROS es el ácido desoxirribonucleico (ADN) como consecuencia de la llegada al interior del núcleo celular. La acción del radical OH^\cdot es capaz de originar más de 20 modificaciones en las bases nitrogenadas, entre ellas se pueden destacar la 8-OHdG, producidas como resultado de la reparación de los daños causados en el ADN en su interacción con la guanina, y que resulta ser una molécula promutagénica, ya que es capaz de aparearse con adenosina en lugar de citosina, e igualmente puede usarse como marcador de daño oxidativo, ya que es eliminada por la orina^{185,186}. Por tanto, las concentraciones séricas de MDA y 8-OHdG están aumentadas en pacientes con EP, como expresión de un mayor estrés oxidativo en la etiología de las lesiones, y su cuantificación, en consecuencia, también contribuirá a valorar el estado prooxidante.

En los últimos años, numerosos estudios clínicos y experimentales básicos han demostrado una fuerte asociación entre el estrés oxidativo y la EP, pero la mayoría de estos estudios periodontales han evaluado la capacidad antioxidante total y el estado oxidativo total para asociarlo con la enfermedad¹⁸⁵. Otros estudios recientes han evaluado marcadores de estrés oxidativo, como los niveles de MDA y 8-OHdG, pero principalmente a nivel local en saliva¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ o en líquido crevicular gingival (fluido procedente del surco gingival)¹⁹⁰, y solo algunos estudios han evaluado los niveles plasmáticos^{191,192}. Aunque los resultados entre los estudios son diferentes, se han observado asociaciones entre la enfermedad y los niveles de MDA sérico¹⁹² y 8-OHdG en orina¹⁹³.

En conjunto, la asociación de la EP con biomarcadores circulantes de estrés oxidativo podría indicar un papel de esta enfermedad en la patogenia de diversas enfermedades inflamatorias sistémicas¹⁸⁵.

2. JUSTIFICACIÓN

La relación entre la EP, la arterioesclerosis y las enfermedades cardiovasculares es de gran interés debido a que son procesos inflamatorios de alta prevalencia, motivo por el cual se convierten en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad.

Hasta la fecha, distintos autores han puesto de manifiesto la relación clínica existente entre la salud oral y la cardiovascular. Así, los estudios de Matilla y cols.^{194,195} y Gostman y cols.¹¹⁸ relacionaron el infarto agudo de miocardio y el riesgo coronario con la salud dental. Syrjansen y cols.¹⁹⁶ e Iwai y cols.¹¹⁹ asociaron las enfermedades vasculares con las infecciones orales; Pucar y cols.¹²² correlacionaron la patogénesis de la arteriopatía coronaria con la flora bacteriana periodontal, y Buhlin y cols.¹²⁹ pusieron de manifiesto que la enfermedad severa es un factor de riesgo para el desarrollo de la arterioesclerosis.

Igualmente, hay diversos estudios, como los de Noack y cols.¹⁷⁰, Ebersole y cols.¹⁷³, Matilla y cols.¹⁷⁶, D'Aiuto y cols.¹⁶¹, Gani y cols.¹³⁰, Yoshii y cols.¹³², Vidal y cols.¹³⁴, Nakajima y cols.¹³¹, entre otros, que han puesto de manifiesto la relación existente entre la EP, la elevación de la PCR, y otros reactantes de fase aguda, que contribuyen al desarrollo de un estado inflamatorio sistémico, como señalan Blake y cols.¹³⁶ en su estudio sobre la determinación de la PCRus como predictor del riesgo cardiovascular. Estos autores señalan que el tratamiento periodontal desempeñaría un papel fundamental en la prevención de los procesos aterogénicos y en las enfermedades cardiovasculares, reduciendo la carga sistémica de citocinas inflamatorias y prooxidantes.

Contrariamente a lo señalado, Syrjansen y cols.¹⁹⁶ suponen que la citada asociación se debe a factores comunes a ambos procesos, y Mattila y cols.¹⁹⁷ solo encuentran elevaciones de la PCR en algunos individuos. Sin embargo, Slade y cols.¹⁷⁷ describen que los enfermos con EP presentan unos niveles de reactantes de fase aguda iguales que los individuos edéntulos.

Por lo tanto, como consecuencia de lo señalado en los estudios previamente mencionados, y dada la naturaleza multifactorial del proceso, se puede afirmar que tanto la importancia de la relación entre EP, como el mecanismo de la asociación con las enfermedades cardiovasculares, no ha sido establecida con claridad hasta la fecha. Mediante el tratamiento de la EP, se pueden disminuir los niveles séricos de citocinas inflamatorias y, en consecuencia, contribuir de una forma beneficiosa a reducir las complicaciones ocasionadas por la inflamación sistémica de bajo grado.

A la vista de los anteriores comentarios, el presente trabajo pretende llevar a cabo un estudio en un grupo de pacientes con EP, determinando los niveles séricos de los marcadores inflamatorios (PCRus, fibrinógeno) y prooxidantes (MDA, 8-OHdG) en el momento del diagnóstico, y después de tres meses del tratamiento periodontal, con objeto de determinar la relación existente entre la EP y los cambios en los niveles séricos de los marcadores inflamatorios y prooxidantes.

Estudios precedentes demuestran una eficacia superior del tratamiento periodontal no quirúrgico si se incorpora como adyuvante doxiciclina tópica^{79,87} en las bolsas, sobre todo cuando la PS es ≥ 5 mm. Por este motivo, también se estudiarán los efectos del tratamiento periodontal no quirúrgico para objetivar los cambios en los niveles séricos de los marcadores inflamatorios PCRus y fibrinógeno, así como los prooxidantes MDA y 8-OHdG en orina. Para ello, se dividirá la muestra en dos grupos: un primer grupo en el que se aplicará doxiciclina tópica como adyuvante, y un segundo grupo donde no se aplicará. Así, la creación de dos grupos tiene por objeto determinar el posible efecto beneficioso de la aplicación tópica de antibiótico en cuanto a la respuesta tisular de los tejidos periodontales y los niveles séricos de los marcadores inflamatorios y prooxidantes.

3. HIPÓTESIS

La EP, como enfermedad inflamatoria crónica, puede asociarse a mayores niveles séricos de marcadores inflamatorios, y como consecuencia, de mayor carga de ROS, condicionando la perpetuación en el tiempo de la carga inflamatoria, y aumentando con ello el riesgo de complicaciones sistémicas.

Así mismo, el tratamiento periodontal no quirúrgico dará lugar a una mejora de la inflamación periodontal y de los parámetros clínicos, con la consiguiente reducción de los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes y con ello, igualmente, del riesgo de complicaciones.

Puesto que los pacientes con EP, a priori, deben presentar una elevación de los niveles de los marcadores inflamatorios y prooxidantes como consecuencia del proceso inflamatorio local y sistémico, se considera que el tratamiento periodontal no quirúrgico como parte del estudio intervencionista del presente trabajo, será capaz de disminuir los citados niveles, como expresión del descenso de la inflamación sistémica, sobre todo en aquellos pacientes con cierto perfil de salud más susceptible. Igualmente, la aplicación de doxiciclina tópica podría generar un mayor beneficio en respuesta al tratamiento, tanto a nivel local, como sistémico, contribuyendo a esclarecer el grado de asociación entre la EP y las complicaciones cardiovasculares^{134,198}.

En este proyecto de investigación se plantea pretende realizar un estudio entre pacientes diagnosticados de EP y los niveles séricos de los marcadores inflamatorios, PCRus y fibrinógeno, así como de los prooxidantes MDA y 8-OHdG. La razón por la cual se utilizará el método de la PCRus es debido a que esta técnica analítica es capaz de detectar niveles de PCR a partir de 0,09 mg/dl, y a que actualmente es utilizada como un indicador para valorar el riesgo cardiovascular^{163,168}.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

La tesis que se plantea tiene como objetivo general el estudio sobre la relación existente entre los parámetros clínicos de la EP y los niveles de los parámetros inflamatorios (PCRus, fibrinógeno) y prooxidantes (MDA, 8-OHdG).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Además del objetivo general planteado, se pretende:

1. Establecer la relación entre las distintas variables clínicas del estudio periodontal con los niveles de los parámetros inflamatorios y prooxidantes a nivel basal.
2. Establecer la relación entre las distintas variables clínicas del estudio periodontal después del tratamiento periodontal no quirúrgico, con los niveles de los parámetros inflamatorios y prooxidantes.
3. Cuantificar el impacto que tiene la utilización de doxiciclina tópica, como medicación adyuvante del tratamiento periodontal, con los niveles de los parámetros inflamatorios y prooxidantes.

5. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

5.1.1 Tipo de estudio

Se realizó un diseño tipo ensayo clínico, en el cual se estudió a una muestra de pacientes con EP crónica, con el objetivo de relacionar el grado de afectación periodontal con los niveles séricos de PCRus, fibrinógeno, MDA y 8-OHdG en orina. Igualmente, se evaluó la respuesta al tratamiento periodontal, con o sin la aplicación adyuvante de doxiciclina tópica en las bolsas periodontales, estudiando tanto los cambios en las variables clínicas periodontales, variables proinflamatorias y prooxidantes.

5.1.2 Periodo del estudio

Para alcanzar los objetivos planteados, el periodo del estudio comprendió una duración de tres meses tras la aprobación por parte del Comité de Ética de Investigación (ANEXO I. 1), estando de esta manera el trabajo estructurado en tres partes:

- La primera parte, con fines analíticos, consistió en la realización de un estudio transversal de asociación cruzada, que se realizó en el momento del diagnóstico, así como un análisis de sangre para determinar el nivel sérico de PCRus y fibrinógeno a nivel basal. También se analizaron los niveles de MDA y 8-OHdG en una submuestra de 31 pacientes.
- La segunda parte, con carácter experimental, en la que se sometió a todos los pacientes a un tratamiento periodontal no quirúrgico y, además, se aplicó doxiciclina tópica a la mitad de los pacientes de la muestra.
- En la tercera parte se realizó una reevaluación periodontal tres meses después de haber concluido el tratamiento, realizándose por segunda vez un nuevo estudio clínico periodontal y determinación de las variables clínicas inflamatorias y prooxidantes en sangre y en orina para la determinación de 8-OHdG.

5.2 SELECCIÓN DE PACIENTES Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

5.2.1 Selección de pacientes

La muestra estuvo constituida por un grupo de pacientes voluntarios de ambos sexos, con o sin antecedentes patológicos de interés, reclutados a partir de la práctica diaria en la clínica de estomatología del autor de la tesis, situada en ciudad de Paterna, Valencia. Se trata, pues, de un muestreo por conveniencia. Por otra parte, los pacientes asignados a la submuestra del grupo DOX son los que presentan lesiones con PS \geq 5mm.

5.2.2 Tamaño de la muestra

Se realizó un estudio previo del tamaño muestral necesario orientado al objetivo general con relación al estudio de las correlaciones entre variables clínicas de EP y parámetros inflamatorios. Se estimó que era necesario un mínimo de 69 pacientes para detectar una correlación de magnitud $r=0,33$ que, aunque calificada como débil, es significativa, con una potencia del 80% y asumiendo un nivel de confianza del 95%.

La hipótesis nula es: "No hay relación entre variable clínica e inflamatoria, $\rho=0$ ". Es decir, una muestra de 69 es suficiente para rechazar la hipótesis nula con una potencia del 80%, una confianza del 95% y una correlación de, al menos, $r=0,33$. La elección del tamaño de la muestra (n), para que tenga significación estadística, en el caso de una población finita, se puede calcular con la siguiente ecuación¹⁹⁹:

$$n = [Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta} / 1/2 \ln[1+r/1-r]]^2 + 3$$

Siendo: (r) el coeficiente de correlación entre dos variables, $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ representa nivel de confianza deseado, donde trabajando con una seguridad del 95%, $\alpha = 0,05$, $Z_{1-\beta} = 0,84$ representa la potencia estadística, viene expresada para el 80%, $\beta = 0,2$ ²⁰⁰.

La muestra final para la investigación estuvo constituida por 70 pacientes con EP. Se trata de 43 mujeres (61,4%) y 27 varones (38,6%), con una edad media de $53,6 \pm 9,2$ años en un rango de 26 a 72 años.

5.2.3 Criterios de inclusión

Se incluyeron a los pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- Presentar diagnóstico de EP crónica, según criterios de la AAP-EFP 2018³, sin que se aprecie sobrecrecimiento gingival.
- Tener entre 18 y 75 años.
- Aceptar la participación en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

5.2.4 Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes que, cumpliendo los criterios anteriores presentasen:

- Edentulismo total o parcial con menos de 14 dientes naturales para el estudio periodontal.
- Hubieran recibido tratamiento periodontal en los últimos seis meses, existiendo a tal efecto una disminución de la actividad inflamatoria.
- Embarazadas o en período de lactancia, debido a la tolerancia inmunológica durante el embarazo.
- Gingivitis úlceronecrotizante (GUN), por tratarse de un proceso agudo o periodontitis úlceronecrotizante (PUN).
- Diagnóstico de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), debido el estado de inmunosupresión asociado.
- Antecedentes recientes de ángor, infarto de miocardio o accidente vascular cerebral (AVC), ya que supone un factor de confusión al elevar los niveles séricos de los biomarcadores.
- Procesos inflamatorios agudos o traumatismos recientes.
- Tratamiento crónico con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o glucocorticoides, debido a que disminuyen la respuesta inmunitaria e inflamatoria.
- Toma de antibióticos en los últimos tres meses, debido a que disminuyen la actividad inflamatoria y por tanto los niveles séricos de biomarcadores.

5.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

5.3.1 Variables sociodemográficas y de confusión

A cada paciente se le realizó una historia clínica completa, recogiendo datos generales demográficos como edad, sexo, hábito tabáquico, antecedentes patológicos, y presencia o no de DM u otros antecedentes patológicos. La influencia de los factores modificadores o de confusión son aquellas condiciones sociodemográficas o patológicas del perfil del paciente capaces de influir en los resultados de las mediciones. En el presente estudio se han considerado, dada su prevalencia, la DM y el tabaquismo. Además, para esta última variable, se consideró el número de cigarrillos día como $<10/\text{día}$ o $\geq 10/\text{día}$. Los datos de cada participante fueron recogidos en la ficha del paciente correspondiente (ANEXO II).

5.3.2 Variables clínicas periodontales

Las variables clínicas e índices que se emplean en el presente estudio traducen a valores numéricos la existencia de una actividad inflamatoria periodontal presente o pasada. Los datos de estas variables clínicas periodontales se recogieron en un periodontograma, realizando seis mediciones por cada diente: tres por vestibular (mesial, distal, medial) y tres por palatino, lingual, y se obtuvieron mediante la sonda milimetrada CP-15 de *Hu-Friedy* (Chicago, IL, EE. UU.), que se trata de una sonda milimetrada de primera generación, con una precisión en las mediciones de ± 1 mm. Se evaluó el estado periodontal de todos los dientes presentes, excepto los terceros molares, dientes parcialmente erupcionados, anquilosados y restos radiculares.

PS

La bolsa periodontal supone una profundización del surco gingival, debido al desplazamiento en dirección apical de la inserción epitelial. Denominamos PS a la distancia en milímetros entre el margen de la encía y el fondo de la bolsa periodontal, en cada pieza dental se mide en seis posiciones, tres por la cara vestibular y tres por la cara palatina o lingual. La valoración se obtiene mediante la suma de los valores

obtenidos dividido por el número de superficies exploradas, y el resultado va expresado en milímetros²⁰¹.

PIC

Se denomina PIC a la distancia medida en milímetros entre el límite amelocementario y el fondo de la bolsa, es decir, la suma de la PS y la recesión, entendida como la distancia medida en milímetros entre el citado límite amelocementario y el margen de la encía. Para hallar el PIC global, se divide el resultado de la suma de las superficies exploradas por el número de superficies, y el resultado se expresa en milímetros²⁰¹.

BOP

El índice BOP modificado de Ainamo y Bay (1975) (o Índice de Lindhe, 1963)²⁰². Examina cuatro superficies del diente, seis superficies según criterios AAP-EFP 2018⁷. Sólo considera sangrado (+) y ausencia de sangrado (-). El resultado se obtiene calculando el porcentaje de superficies sangrantes, esperando entre 15 y 30 segundos para su lectura tras el sondaje. Aporta información sobre la actividad inflamatoria gingival y sobre la progresión de la enfermedad.

Índice de placa (IP)

El IP de Silness y Løe (1964)²⁰³ se emplea para controlar el grado de higiene, valora el grosor de la placa dental y describe la presencia de placa en grados de 0 a 3 unidades arbitrarias (UA) y una medición por diente, utilizando en su forma reducida, los seis dientes de Ranfjord²⁰⁴. Un índice es un indicador capaz de traducir una situación clínica en un valor numérico, como IP o BOP, y son por definición valores adimensionales, expresados como UA o porcentajes. Por otra parte, la PS o PIC son parámetros clínicos precisos y no reciben el calificativo de índices.

Además de estos parámetros periodontales, se registró y calculó el número de dientes totales, el nº de dientes con una PS de 1-3 mm., dientes con una PS \geq 4 mm., nº de sitios con PS \geq 4 mm., dientes con una PS \geq 6 mm., porcentaje de sitios con PS 1-3 mm., PS 4-5 mm., PS > 6 mm.

5.3.3 Variables bioquímicas inflamatorias

Las variables bioquímicas fueron determinadas a partir de muestras de sangre por el laboratorio Analclinic (Mislata-Valencia, España).

PCRus

La PCR medida en rango ultrasensible es uno de los marcadores que aparecen en la fase aguda de procesos inflamatorios de cualquier naturaleza, tanto agudos como crónicos, los valores séricos normales de la PCR son < 0,5 mg/dl. Dada la naturaleza crónica de la EP, el presente estudio se basó en la búsqueda de la posible correlación mediante la determinación de la PCRus, ya que ésta permite detectar niveles a partir de 0,09 mg/dl, descartándose valores a partir de 10 mg/dl, más propios de procesos agudos. Los niveles séricos de PCRus se cuantificaron mediante un ensayo inmunonefelométrico (*Dade Behring, Marburg, Alemania*).

Fibrinógeno

Es una glicoproteína con una vida media de 3 a 6 días, con una función fundamental durante el proceso de la coagulación, pasando a fibrina bajo la acción de la trombina, y sus niveles plasmáticos oscilan entre 150 y 450 mg/dl. Durante los procesos inflamatorios aumenta su valor entre 2 y 20 veces, siendo, por tanto, un reactante de fase aguda. Los niveles de fibrinógeno se obtuvieron mediante la técnica Coagulometría-Thrombina-Clauss time, utilizando un analizador automático Solea 100 (*Biolabo diagnostics, Maizy, Francia*).

5.3.4 Variables bioquímicas de estrés oxidativo

MDA

Se trata de un lipoperóxido resultado de la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, sus valores en función de sus niveles séricos se expresan en $\mu\text{mol/L}$. Es un indicador de estrés oxidativo y daño tisular, y se consideran normales los valores < 2 $\mu\text{mol/L}$.

8-OHdG

Se trata de uno de los productos resultantes de la oxidación de la base nitrogenada guanina, es un indicador de estrés oxidativo y de daño del ADN. Su determinación se hace en muestras de orina midiéndose en $\mu\text{g/g}$ de creatinina, siendo sus valores normales de 6,0-14,0 $\mu\text{g/g}$.

5.4 PROCEDIMIENTO

5.4.1 Protocolo del estudio y recogida de datos

El estudio se llevó a cabo en las siguientes fases:

Visita de diagnóstico

Se analizó el estado periodontal de los pacientes y se diagnosticó EP, según los criterios de la AAP-EFP 2018⁷.

Visita de selección

Consistió en la explicación del estudio y la presentación al paciente de los documentos preceptivos:

- Presentación y firma de la hoja de información al participante (ANEXO I. 3)
- Aceptación voluntaria del paciente de su participación en el estudio, con la firma del consentimiento informado y la Ley Orgánica de Protección de datos Personales (LOPD) (ANEXOS I. 4)
- Anamnesis donde se recogieron datos médicos, con objeto de verificar si cumple los criterios de selección, historial dental y periodontograma (ANEXOS II. 1)

El paciente diagnosticado clínicamente de EP se remitió al laboratorio para la extracción de una muestra de sangre, en la cual se determinaron los niveles séricos de PCRus, de fibrinógeno y de MDA, así como una muestra de orina para la determinación de 8-OHdG.

Visita de tratamiento

El tratamiento periodontal no quirúrgico que se aplicó a los pacientes seleccionados consistió en una única sesión siguiendo el procedimiento *full mouth*²⁰⁵⁻²⁰⁹:

- Profilaxis supragingival mediante aparato de ultrasonidos (*Satelec, Acteon, Merignac, Francia*).
- RAR mediante curetas de Gracey (*Hu-Friedy, Chicago, IL, EE. UU.*), previa anestesia local infiltrativa, en dientes con bolsas PS \geq 5 mm, (*Artinibsa*[®] 40/0,005 mg/ml, *Inibsa, España*). El desbridamiento mecánico se hizo en una sesión.

- Irrigación con clorhexidina 0,2%, (Clorhexidina Lacer[®], Lacer S.A., Barcelona, España).
- Aplicación de doxiciclina tópica^{87,210} (Ligosan[®], Heraeus Kulzer, Kulzer GmbH, Leipziger Straße 2, 63450 Hanau, Alemania.), en las bolsas con una PS \geq 5mm., en el 50% de la muestra. Es conocido que prácticamente todos los microorganismos relacionados con la EP son sensibles a las tetraciclinas²¹¹⁻²¹³, de ahí la utilización de la doxiciclina.
- Recomendaciones higiénicas y de mantenimiento periodontal²¹⁴: Cepillado 3 veces/día mediante la técnica de Bass²¹⁴ con un cepillo de filamentos blandos, lo que permitirá la remoción de la placa del surco gingival de forma eficaz. La técnica de Bass consiste en inclinar el cepillo 45° con respecto al diente, efectuando movimientos horizontales suaves, y verticales de arrastre, en el caso de la técnica de Bass modificada. Utilización de cepillos interdetales, que eliminan la placa en los espacios Interdentales, normalmente poco accesibles con el cepillado habitual. Uso de colutorio de clorhexidina de uso diario al 0,05%, dos veces/día, lo que impide la formación de placa.

Todas estas medidas tienen por objeto reducir la carga bacteriana del periodonto y de las distintas superficies dentales desestructurando el *biofilm* e impidiendo su formación una vez realizado el tratamiento periodontal.

Visita de reevaluación

La reevaluación se efectuó a los tres meses de concluido el tratamiento periodontal, ya que el *biofilm* se reestructura durante este periodo de tiempo²¹⁵. La reevaluación se estructuró en dos partes:

- Reevaluación clínica periodontal. Se efectuó mediante una valoración precisa del estado periodontal, con la medición de las variables clínicas periodontales del estudio.
- La reevaluación bioquímica. Se realizó mediante la obtención de una nueva muestra de sangre, para determinar el nivel sérico de la PCRus, fibrinógeno, MDA y de orina para la determinación de 8-OHdG.

5.4.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el *software SPSS (SPSS Statistics Inc. Chicago, IL, EE. UU.)*.

Con el fin de cumplir con los objetivos que fueron planteados en esta tesis, se hizo necesaria la aplicación de técnicas de análisis estadístico, que dependieron del tipo de variable y de los datos recogidos durante el trabajo de campo. El tamaño de la muestra y la técnica de análisis influye en la significación estadística. Así, los estudios de correlaciones y la comparación de medias mediante la *t-Student* proporcionan datos significativos, incluso con muestras reducidas, al contrario que los modelos de regresión.

Se dispone de información de parámetros clínicos en tiempo basal (T0), así como de los bioquímicos PCRus, fibrinógeno, MDA y 8-OHdG. Los pacientes se clasifican en 2 grandes grupos independientes según tratamiento; grupo control (n=25) o grupo con doxiciclina tópica (DOX) (n=45). A los 3 meses (T1) se repiten las mediciones de todas las variables mencionadas, consideradas primarias para la investigación. Las analíticas de las variables de estrés oxidativo se realizan en una submuestra de 31 pacientes (n=15) correspondiente al grupo DOX y (n=16) al grupo control.

Por tanto, se trata de dos estudios bien diferenciados:

- General: Relación entre las variables clínicas periodontales y inflamatorias en el total de 70 pacientes de la muestra y según grupos (DOX/control).
- Estrés oxidativo (EO): Relación entre variables clínicas periodontales y de estrés oxidativo en el subtotal de 31 pacientes y según grupo (DOX/control).

Análisis descriptivo

Las variables continuas se describieron mediante la media \pm desviación estándar (DE), previamente determinando que siguen una distribución normal mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Las variables de tipo categórico se describirán mediante frecuencias absolutas y porcentajes.

Análisis bivariante

Para el estudio entre dos grupos formados por variables continuas objeto del estudio, parámetros bioquímicos y periodontales, se aplican las siguientes herramientas estadísticas:

- Test de la *t-Student* para muestras independientes

Test que compara las medias de muestras con variables continuas de muestras independientes, para su aplicación se debe de tener en cuenta que se cumplen los criterios de normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Se emplea para comparar las variables periodontales y bioquímicas entre dos grupos. La prueba *U de Mann-Whitney* sería el equivalente no paramétrico.

- Test χ^2

Test empleado para estudiar la asociación entre dos variables categóricas y evidenciar su dirección y magnitud, estableciendo así el grado de relación que poseen. Se estudiaron tablas de contingencia 2x2, que permiten comparar distintos parámetros del estudio: bioquímicos, periodontales o perfil del paciente.

- Correlaciones bivariadas

El coeficiente de correlación de Pearson es un método paramétrico que requiere de criterios de normalidad para su aplicación y que mide el grado de asociación de los puntos a una línea recta. Se utiliza para la estimación de las correlaciones periodontales y bioquímicas a nivel basal y después del tratamiento periodontal. El coeficiente de correlación de *Spearman* (Rho) es la forma no paramétrica.

Análisis multivariante

- Modelo de regresión logística binaria

Su utilización es pertinente cuando la variable dependiente es dicotómica y se desee identificar predictores de un suceso, la variable dependiente es el cociente $p / (1-p)$, es decir la Odds ratio (OR). Estudiará la influencia de las distintas variables clínicas sobre las variables bioquímicas para un intervalo de confianza del 95%.

- ANOVA con medidas repetidas

Conocido como modelo lineal univariante o bien como ANOVA de medidas repetidas, es un análisis de tipo longitudinal, ya que mide en más de una ocasión la variable respuesta. El objetivo de los análisis longitudinales es estudiar los cambios que tienen lugar en la variable respuesta en función del tiempo, y dado que los cambios se estudian dentro del mismo individuo, lleva a estimaciones mucho más precisas, ya que cada individuo es su propio control, es decir, está autoemparejado, lo que reduce el ruido o variabilidad aleatoria. Es decir, comparar los valores de las variables periodontales y bioquímicas en estado basal y a los tres meses del tratamiento periodontal con o sin la utilización de doxiciclina.

- Regresión lineal multivariante

Se trata de un análisis de la varianza con múltiples variables, dándonos la posibilidad de relacionar dos o más variables independientes (variables explicativas), como las variables periodontales que resultaron distintas en su medición basal y a los tres meses del tratamiento, con una variable dependiente (variable respuesta).

El nivel de significación empleado en los análisis ha sido el 5% ($\alpha=0.05$). Una *t-Student* alcanza una potencia del 80% para detectar como significativo un tamaño de efecto $d=0,3$ (medio-grande) en las diferencias de un parámetro entre grupo control y test, para un nivel de confianza del 95%. Para detectar efectos intra-sujetos (cambios de T0 a T1), la potencia es del 84,5% para un tamaño de efecto $d=0,15$ (medio-pequeño).

5.5 ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Principios éticos

Este estudio fue diseñado según los criterios de presentación en epidemiología *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology* (STROBE), los principios de ética establecidos en la declaración de Helsinki (Finlandia 1964) y de la Convención de Oviedo en relación con los derechos humanos en las prácticas biomédicas (Oviedo 1997).

Comité de ética

El protocolo del presente estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Arnau de Vilanova-Llíria, (Departament de Salut València), con fecha 18/09/2019, código RAM-LIG-2019-01 (ANEXO I. 1) y de la investigación con medicamentos, por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) Nº EudraCT 2019-002239-27 (ANEXO I. 2).

Hoja de información al participante y consentimiento informado

Los pacientes aceptaron participar en el estudio dando su consentimiento por escrito, previamente informados mediante la hoja de información al paciente (ANEXO I. 3), sobre sus características y finalidad, de acuerdo con la ley 41/2002, de 14 de noviembre de 2002, referente a los derechos y obligaciones con respecto a la documentación clínica y la LOPD 3/2018, de 5 de diciembre de 2018 (ANEXOS I. 4).

Protección de datos personales

El presente estudio cumple con el Reglamento del Parlamento Europeo 2016/679 y del Consejo de la Unión Europea, de 27 de abril de 2016, relativo al tratamiento de datos de las personas físicas. El tratamiento de los datos personales obtenidos durante el estudio fue anonimizado empleando una codificación alfanumérica, destruidos tras su finalización y ajustados a la LOPD 3/2018, de 5 de diciembre de 2018 (ANEXOS I. 4).

6. RESULTADOS

6.1 ESTUDIO TRANSVERSAL. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN

6.1.1 Estudio de la severidad de enfermedad periodontal

Los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados de EP crónica, con los datos registrados en un periodontograma completo, atendiendo a la definición y criterios diagnósticos según el *Word Workshop* de la AAP-EFP 2017.

La muestra para la investigación estuvo constituida por un total de 70 pacientes con EP. Se dispone de información de parámetros clínicos periodontales, así como de los bioquímicos PCRus, fibrinógeno, MDA y 8-OHdG, en tiempo basal (T0) y a los 3 meses del tratamiento periodontal no quirúrgico (T1).

Los pacientes se clasificaron en 2 grupos según tratamiento o no con doxiciclina tópica, existiendo así un grupo DOX (n=25) y grupo control (n=45). Los parámetros de estrés oxidativo (MDA y 8-OHdG) sólo se evaluaron en una submuestra de 31 pacientes (15 del grupo DOX y 16 del grupo control). De la muestra inicial de 73 pacientes, tres no acudieron a la reevaluación y fueron eliminados. Basándose en la severidad de EP, de los 70 pacientes del estudio, mostraron estadio I el 2,9% (n=2) de los pacientes, estadio II el 15,7% (n=11), estadio III el 57,1% (n=40) y estadio IV el 24,3% (n=17) (Figura 2)

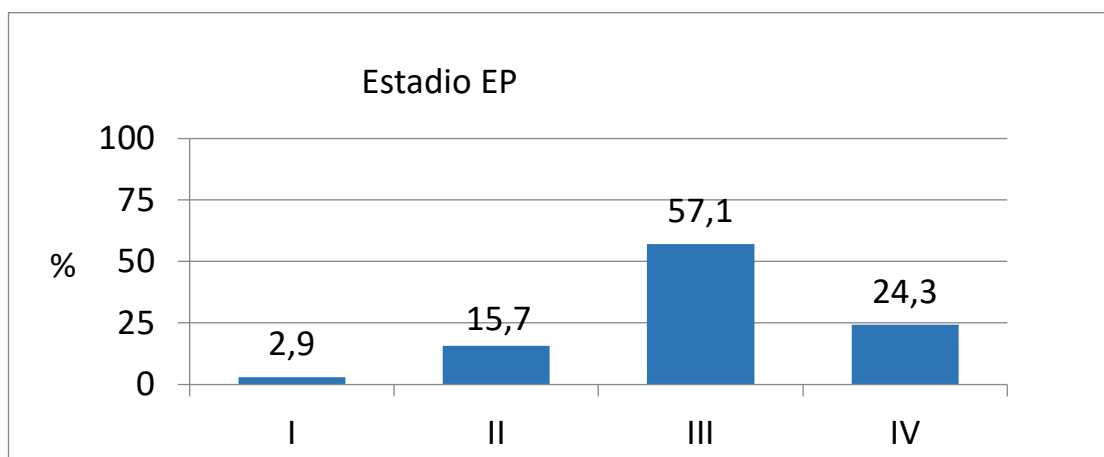


Figura 2. Distribución de los pacientes según estadio.

Los resultados se expresan como %.

A partir de este punto, una vez fue descrita la EP de la población de estudio, se obtiene la muestra dividida por gravedad/estadios, la cual se analizó a continuación.

6.1.2 Homogeneidad de los grupos según estadio de enfermedad periodontal

Con respecto a las variables de perfil, a efectos de toma de decisión sobre la inclusión o no en modelos posteriores, se realizó un análisis de homogeneidad de los grupos en cada estadio. En la Tabla 5 se describe el perfil demográfico, hábitos nocivos y prevalencia de DM en el total de pacientes.

Tabla 5. Variables de perfil de los pacientes según estadio.

	ESTADIO EP					p-valor
	Total	I	II	III	IV	
N	70	2	11	40	17	
SEXO						
Hombre	27 (38,6)	0 (0,0)	2 (18,2)	18 (45,0)	7 (41,2)	0,855
Mujer	43 (61,4)	2 (100)	9 (81,8)	22 (55,0)	10 (58,8)	
EDAD (años)	53,6±9,2	57,0±7,1	48,6±11,4	53,1±9,0	57,6±6,9	0,113
GRUPO DE EDAD						
<50 años	23 (32,9)	0 (0,0)	6 (54,5)	15 (37,5)	2 (11,8)	0,127
50-59 años	26 (37,1)	1 (50,0)	3 (27,3)	14 (35,0)	8 (47,1)	
>=60 años	21 (30,0)	1 (50,0)	2 (18,2)	11 (27,5)	7 (41,2)	
DIABETES						
No	63 (90,0)	2 (100)	11 (100)	36 (90,0)	14 (82,4)	0,694
Sí	7 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (10,0)	3 (17,6)	
TABAQUISMO						
No fuma	45 (64,3)	1 (50,0)	5 (45,5)	28 (70,0)	11 (64,7)	0,127
<10 cig. /d	10 (14,3)	0 (0,0)	6 (54,5)	3 (7,5)	1 (5,9)	
>=10 cig. /d	15 (21,4)	1 (50,0)	0 (0,0)	9 (22,5)	5 (29,4)	

Los datos se expresan como n (% de casos) o como media ± desviación estándar y se analizaron mediante test Chi², test exacto de Fisher o mediante test t-Student de 2 muestras, respectivamente.

De los 70 pacientes incluidos en el estudio, 43 eran mujeres (61,4%) y 27 varones (38,6%), con una edad media de $53,6 \pm 9,2$ años en un rango de 26 a 72 años. Se constató la homogeneidad alcanzándose distribuciones semejantes en aspectos como la edad y el sexo, siendo más de la mitad de la población de estudio mujeres y mayores de 50 años. Solamente siete pacientes de la totalidad de la muestra eran diabéticos, cuatro del estadio III y tres del estadio IV, sin existir diferencias significativas entre los grupos. Respecto al hábito tabáquico, se recogió información acerca de si el paciente era fumador o no, y si fumaba más o menos de 10 cigarrillos al día, y no existieron diferencias entre los diferentes grupos según estadio, siendo la mayoría de los pacientes (64,3%) no fumadores.

De este análisis de homogeneidad de los grupos según estadio respecto a ciertas variables de perfil se concluyó que los diferentes grupos por estadio exhiben un perfil similar, sin mostrar diferencias significativas.

6.1.3 Comparación de los grupos por estadio de enfermedad periodontal

Se realizó un análisis descriptivo e inferencial de todas las variables estudiadas: periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo comparando entre los grupos por estadio de la enfermedad.

Parámetros clínicos periodontales

Los parámetros clínicos periodontales recogidos y calculados para estudiar la EP de la población total dividida por estadios, se muestran en la Tabla 6. Como era de esperar, a medida que aumenta la severidad/estadio, peor estado periodontal refleja los parámetros (Figura 2). Se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos según estadio respecto a todas las variables clínicas periodontales, excepto en el IP, el cual va más ligado al hábito de cepillado que a la enfermedad en sí, y en el índice BOP, el cual, aunque no mostró diferencias significativas entre los grupos ($p=0,206$), refleja una tendencia a mayor sangrado al sondaje a medida que se incrementa el estadio de severidad (Tabla 6 y Figura 3).

Tabla 6. Parámetros periodontales (t0) de la población total según estadio.

	ESTADIO EP					p-valor
	Total	I	II	III	IV	
N	70	2	11	40	17	
PS (mm)	3,32±0,76	2,53±0,06	2,73±0,42	3,28±0,72	3,89±0,65	<0,001
PIC (mm)	3,50±0,76	2,68±0,17	2,87±0,39	3,46±0,70	4,12±0,68	<0,001
nº sitios PS ≥4mm	53,2±31,8	20,0±15,6	34,0±24,3	56,9±33,6	62,6±23,6	0,020
nº sitios PS ≥6mm	12,7±14,0	0,00±0,00	0,73±0,79	15,2±15,6	16,1±10,5	<0,001
% sitios PS ≥4mm	36,8±22,1	3,11±3,46	20,8±15,3	36,8±21,3	51,4±17,5	<0,001
% sitios PS 1-3mm	63,2±22,1	96,9±3,46	79,2±15,3	63,2±21,3	48,6±17,5	<0,001
% sitios PS 4-5mm	27,7±14,7	3,11±3,46	20,3±15,4	27,1±13,4	36,7±11,9	0,001
% sitios PS ≥6mm	9,13±9,97	0,00±0,00	0,45±0,47	9,6±10,2	14,7±8,8	<0,001
IP	0,75±0,75	0,28±0,17	0,72±0,84	0,7±10,65	0,94±0,93	0,560
BOP (%)	30,9±23,4	22,5±10,6	24,9±20,8	28,6±20,5	41,2±30,1	0,206

Los datos se muestran como media ± desviación estándar y se analizaron mediante una ANOVA de una P-valor<0,05 (resaltado en negrita) indica diferencias significativas entre los grupos.

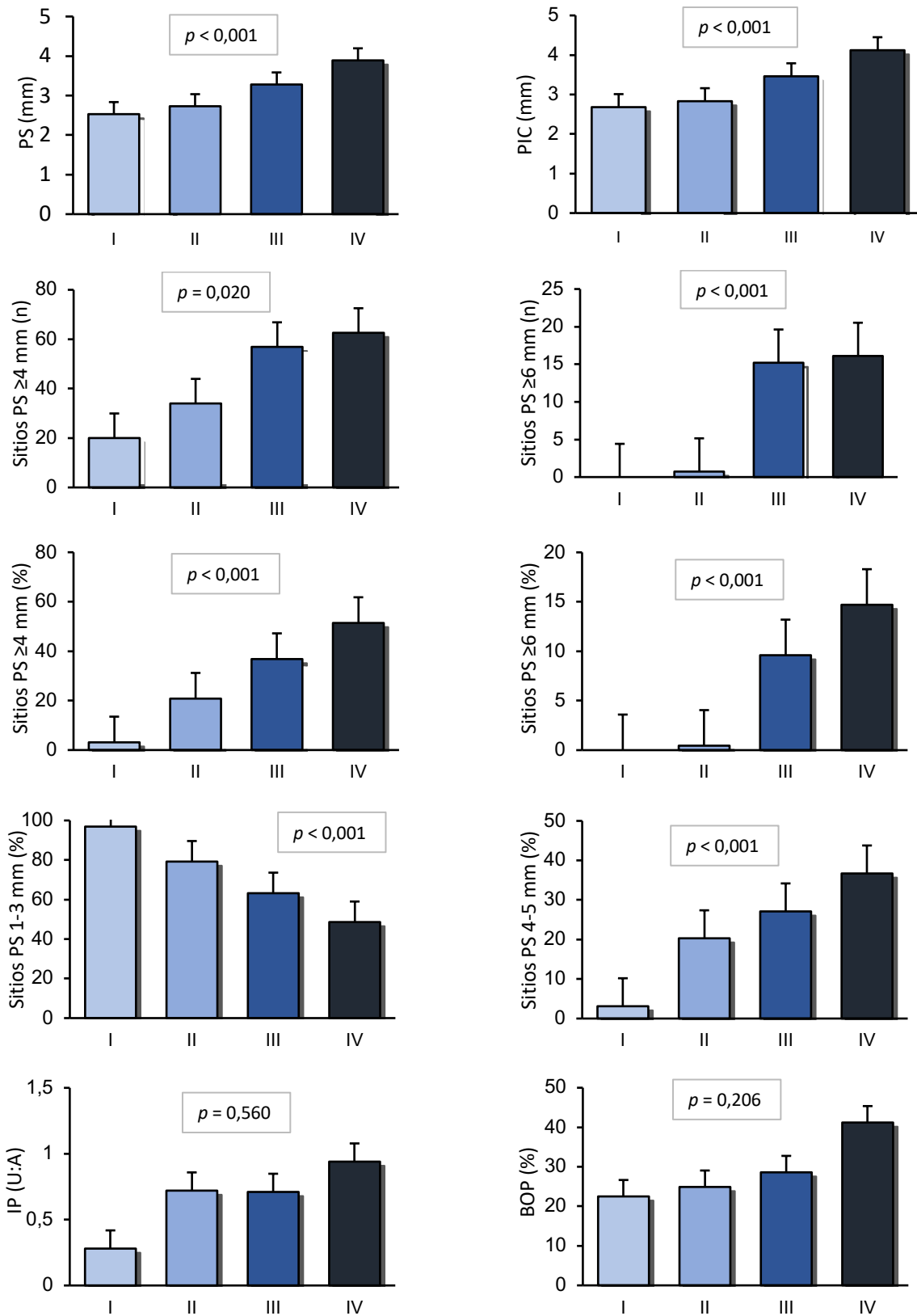


Figura 3. Parámetros periodontales de la muestra por estadio.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P-valor $< 0,05$ indica diferencias significativas cuando grupos fueron comparados mediante una ANOVA de una vía.

Parámetros inflamatorios

Los niveles de PCRus y fibrinógeno en suero de los pacientes según estadio, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros inflamatorios a nivel basal (t_0) de la población total según estadio.

	ESTADIO EP					p-valor
	Total	I	II	III	IV	
N	70	2	11	40	17	
PCRus (mg/dL)	0,29±0,30	0,03±0,01	0,19±0,14	0,25±0,25	0,47±0,40	0,018
fib (mg/dL)	351,7±76,2	322,5±54,5	325,1±61,1	342,5±78,5	394,1±69,2	0,055

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar y se analizaron mediante ANOVA de una vía.

Respecto a los parámetros inflamatorios evaluados en suero, se observaron diferencias significativas en los niveles de PCRus entre los cuatro estadios de EP y una fuerte tendencia a la significación en los niveles de fibrinógeno, siendo los niveles en suero de PCRus y fibrinógenos mayores conforme se incrementa la gravedad de la enfermedad (Figura 4).

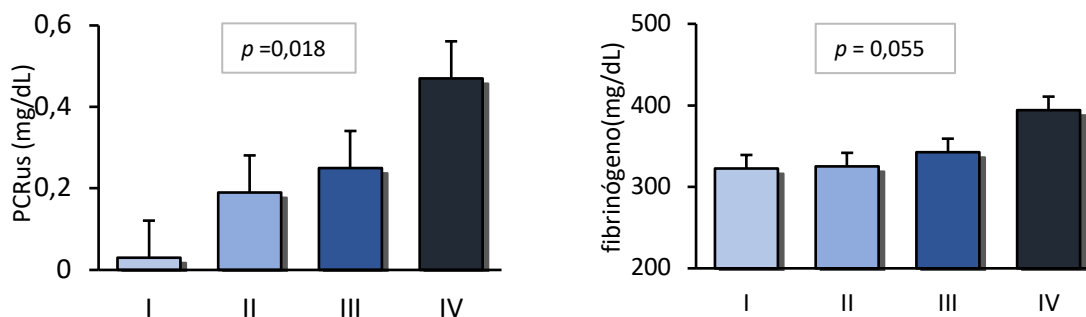


Figura 4. Parámetros inflamatorios de la muestra por estadio.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P-valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando grupos fueron comparados mediante una ANOVA de una vía.

Parámetros de estrés oxidativo

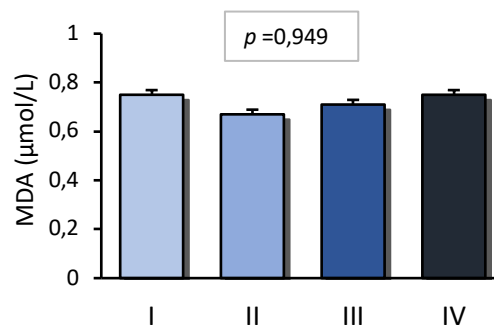
Los niveles de MDA en suero y de 8-OHdG en orina de los pacientes según estadio, se muestran en la Tabla 8 y (Figura 5).

Tabla 8. Parámetros de estrés oxidativo a nivel basal (t0) de la población total según estadio.

	ESTADIO EP					p-valor
	Total	I	II	III	IV	
N	31	2	3	13	13	
MDA (μmol/L)	0,72±0,23	0,75±0,35	0,67±0,15	0,71±0,22	0,75±0,27	0,971
8OHdG (μg/g)	9,03±3,70	4,10±3,96	13,1±2,76	7,94±3,18	9,85±3,34	0,021

Los datos se muestran como media ± desviación estándar y se analizaron mediante una ANOVA de una vía.

Como marcadores de estrés oxidativo, se evaluaron los niveles en suero de MDA y los niveles en orina de 8-OHdG. Se observó una diferencia significativa entre los grupos por severidad en los niveles de 8-OHdG, siendo los niveles de dicho parámetro más elevados en los estadios II, III y IV, que en los pacientes con EP inicial estadio I. Los niveles en suero



de MDA fueron homogéneos entre los grupos, no observándose diferencias significativas (Tabla 8).

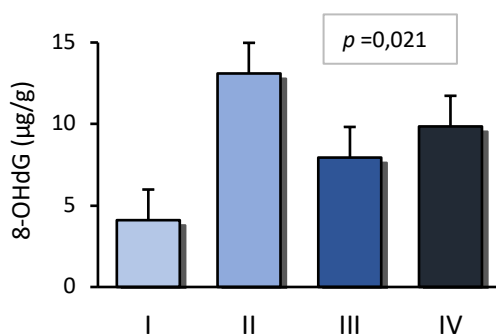


Figura 5. Parámetros de estrés oxidativo de la muestra por estadio.

Los resultados se expresan como media ± error estándar. P-valor <0,05 indica diferencias significativas cuando grupos fueron comparados mediante una ANOVA de una vía.

6.1.4 Estudio de la probabilidad de enfermedad periodontal. Regresión logística binaria

Se pretende estudiar la influencia de las distintas variables de perfil en la probabilidad de EP, así como si se puede analizar la influencia de estas variables en la probabilidad de cada estadio. Esto permite relacionar la probabilidad de un cierto nivel de gravedad de la enfermedad con los otros factores considerando dos independientes y haciendo modelos de regresión logística para cada uno de ellos (Tabla 9):

- Grado I-II/III-IV
- Grado I-II-III/IV

Tabla 9. Perfil demográfico y clínico de los pacientes según EP grado III-IV.

	EP		OR	95% CI	p-valor
	I-II	III-IV			
N	13	57			
SEXO					
Mujer	11 (84,6)	32 (56,1)	1		
Hombre	2 (15,4)	25 (43,9)	4,30	0,87-21,2	0,073
GRUPO DE EDAD					
<50 años	6 (46,2)	17 (29,8)	1		0,533
50-59 años	4 (30,8)	22 (38,6)	1,94	0,47-8,00	0,358
>=60 años	3 (23,1)	18 (31,6)	2,12	0,46-9,84	0,338
DIABETES					
No	13 (100)	50 (87,7)			
Sí	0 (0,0)	7 (12,3)	--	--	0,183 (Chi ²)
TABAQUISMO					
No fuma	6 (46,2)	39 (68,4)	1		0,006**
<10 cig. /d	6 (46,2)	4 (7,0)	0,10	0,02-0,47	0,004**
>=10 cig. /d	1 (7,7)	14 (24,6)	2,15	0,24-19,5	0,495

Número de pacientes (%) o media \pm desviación estándar. Resultados de regresión logística binaria simple, OR, intervalo de confianza 95%. Categoría de referencia: EP grado I-II. Test Chi² si OR no estimable. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Se observa que los pacientes que fuman poco (<10 cig/d) disminuyen significativamente la probabilidad de tener una EP III-IV respecto a los no fumadores (OR=0,10; $p=0,004$). También se observó una tendencia que implica al sexo del paciente. Un varón multiplica por más de 4 (OR=4,30; $p=0,073$) su riesgo de EP III-IV respecto a una mujer.

Tabla 10. Perfil demográfico y clínico de los pacientes según EP grado IV.

	EP		OR	95% CI	p-valor
	I-II-III	IV			
N	53	17			
SEXO					
Mujer	33 (62,3)	10 (58,8)	1		
Hombre	20 (37,7)	7 (41,2)	1,16	0,38-3,52	0,800
EDAD (años)	52,3±9,5	57,6±6,9	1,07	1,00-1,15	0,042*
GRUPO DE EDAD					0,137
<50 años	21 (39,6)	2 (11,8)	1		
50-59 años	18 (34,0)	8 (47,1)	4,67	0,88-24,9	0,071
>=60 años	14 (26,4)	7 (41,2)	5,25	0,95-29,1	0,057
DIABETES					
No	49 (92,5)	14 (82,4)	1		
Sí	4 (7,5)	3 (17,6)	2,63	0,52-13,1	0,240
TABAQUISMO					0,440
No fuma	34 (64,2)	11 (64,7)	1		
<10 cig. /d	9 (17,0)	1 (5,9)	0,34	0,04-3,02	0,343
>=10 cig. /d	10 (18,9)	5 (29,4)	1,55	0,43-5,51	0,502

Número de pacientes (%) o media ± desviación estándar. Resultados de regresión logística binaria simple, OR, intervalo de confianza 95%. Categoría de referencia: EP grado<IV. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Como se observa en la Tabla 10, sólo la edad influye significativamente en el diagnóstico de una EP grado IV. Concretamente, por cada año adicional de edad, el riesgo de una expresión de tipo IV se eleva un 7% (OR=1,07, $p=0,042$).

De los dos modelos se deduce que:

- Una mayor edad discrimina entre pacientes con EP estadio IV respecto al resto.
- Ser varón aumenta la probabilidad de estadios III/IV; pero no particularmente el estadio IV.
- El hábito tabáquico muestra una asociación peculiar; en especial, la categoría de bajo consumo (<10 cigarrillos/día), que parece favorecer un diagnóstico de gravedad estadio I/II (leve-moderado).

6.1.5 Correlaciones bivariadas de las variables periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo a nivel basal

Se realizaron análisis de correlación bivariada entre variables periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo (Tabla 5), con el fin de determinar si existe una relación entre el estado clínico del periodonto y los niveles sistémicos de los parámetros inflamatorios y de los parámetros prooxidantes. Se observaron múltiples correlaciones de los parámetros clínicos periodontales con los niveles séricos de fibrinógeno. Los niveles de fibrinógenos se correlacionaron directamente con los valores de PS, PIC, bolsas ≥ 4 mm, ≥ 6 mm y BOP, y lógicamente de forma inversa con el porcentaje de sitios con PS de 1-3 mm. De una forma menos significativa se observó una correlación de los niveles séricos de PCRus con los valores de PIC y una tendencia a la significación estadística con los valores de PS y de bolsas ≥ 6 mm.

Con respecto a los parámetros prooxidantes, no se observaron correlaciones de los parámetros clínicos periodontales con los niveles séricos de MDA, ni con los niveles de 8-OHdG en orina (Tabla 11).

Tabla 11. Correlación de parámetros periodontales con inflamatorios y prooxidantes en t0.

	PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
	r	p	r	p	r	p	r	p
PS	0,231	0,055	0,318	0,007	0,141	0,450	0,148	0,436
PIC	0,241	0,045	0,330	0,005	0,112	0,548	0,149	0,433
Nº sitios PS≥4mm	0,049	0,686	0,206	0,087	-0,08	0,968	0,047	0,804
Nº sitios PS≥6mm	0,130	0,282	0,236	0,049	0,018	0,921	0,062	0,743
% sitios PS≥4mm	0,138	0,256	0,259	0,030	0,102	0,587	0,096	0,615
% sitios PS 1-3mm	0,122	0,317	0,225	0,063	0,039	0,836	0,139	0,474
% sitios PS 4-5mm	0,150	0,215	0,215	0,074	0,066	0,725	0,156	0,411
% sitios PS≥6mm	0,224	0,062	0,302	0,011	0,121	0,517	0,122	0,521
IP	0,049	0,684	0,038	0,753	0,217	0,242	0,038	0,842
BOP	0,127	0,294	0,320	0,007	0,075	0,690	0,137	0,470

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor <0,05 (resaltado en negrita) indica correlación estadísticamente significativa.

Posteriormente, se analizaron las correlaciones entre los parámetros inflamatorios y los parámetros prooxidantes y se observó únicamente una correlación significativa entre los niveles séricos de PCRus y fibrinógeno.

Tabla 12. Correlación de parámetros inflamatorios y prooxidantes en t0.

	PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
	r	p	r	p	r	p	r	p
PCRus								
Fib	0,535	<0,001						
MDA	0,181	0,331	-0,098	0,600				
8-OHdG	-0,027	0,888	-0,125	0,511	0,143	0,450		

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor <0,05 (resaltado en negrita) indica correlación estadísticamente significativa.

No se observa correlación entre parámetros inflamatorios y prooxidantes, únicamente entre PCRus y fibrinógeno (Tabla 12). Dado que los niveles séricos de fibrinógeno fueron los que más se correlacionaron, posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión lineal multivariante.

6.1.6 Regresión lineal multivariante

Se realizó un análisis de regresión lineal multivariante con el fibrinógeno como variable dependiente y como variables independientes todas aquellas variables del estudio con las que se correlacionó (PS, PIC, número de sitios con PS ≥ 6 mm, % de sitios con PS ≥ 4 mm, % sitios con PS 1-3 mm, % sitios con PS ≥ 6 mm, BOP y PCRus), utilizando el método por pasos (*stepwise method*), para detectar el mínimo conjunto de ellas que explica la máxima variabilidad del fibrinógeno (Tabla 13).

Tabla 13. Modelo de regresión multivariante del fibrinógeno.

Variable dependiente	Variables independientes	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	p-valor
		B	ET	β	
fibrinógeno	PCRus	132,52	25,32	0,520	<0,001
	BOP	0,801	0,321	0,247	0,015
	R ² corregida		0,336		
	R		0,596		
		p	<0,001		

En este modelo de regresión multivariante se observó que la PCRus ($\beta = 0,520$) y BOP ($\beta = 0,247$) se asociaban independientemente con los niveles séricos de fibrinógeno, explicando así el 34% de la variable dependiente. La variable BOP fue la única variable incorporada al modelo como significativa ($p = 0,015$). BOP representa el porcentaje de sitios que muestran sangrado al sondaje, siendo normalmente aquellos sitios con mayor bolsa periodontal e inflamación gingival. La variable BOP es la variable que refleja la inflamación periodontal local, y es lógico que exista una correlación con los niveles de fibrinógeno como marcador de inflamación sistémica. Se ha estimado $B = 0,801$, esto es, por cada 1% adicional de BOP, el incremento esperado de fibrinógeno es de 0,8 unidades, en promedio.

Resumen de resultados referente al estudio trasversal

1. Comparación de los grupos por estadio
 - Se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos según estadio respecto a todas las variables clínicas periodontales.
 - Se aprecia la existencia de relación entre la gravedad de la enfermedad y los niveles séricos de PCRus y de fibrinógeno.
 - Se observó una diferencia significativa entre los grupos por severidad en los niveles de 8-OHdG.
 - Con respecto a los factores modificadores o de confusión, el tabaquismo parece estar relacionado con un agravamiento de los parámetros clínicos periodontales.

2. Estudio de la probabilidad de EP
 - Se observa que los pacientes que fuman <10 cigarrillos/día disminuyen significativamente su probabilidad de una EP III-IV respecto a los no fumadores.
 - Solo la edad influye significativamente en el diagnóstico de una EP grado IV.

3. Correlaciones bivariadas ente las variables periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo a nivel basal
 - Se observaron múltiples correlaciones de los parámetros clínicos periodontales relacionados con el sondaje y el BOP, con los niveles séricos de fibrinógeno.
 - La existencia de correlación entre los niveles séricos de PCRus con los valores de PIC y una tendencia a la significación estadística con los valores de PS y de bolsas ≥ 6 mm.
 - Los niveles séricos de fibrinógeno fueron los que más se correlacionaron con los parámetros periodontales.
 - Se observó una diferencia significativa entre los grupos por severidad en los niveles de 8-OHdG.
 - No se observaron correlaciones de los parámetros clínicos periodontales con los niveles séricos de MDA ni con los niveles de 8-OHdG en orina.

4. Regresión lineal multivariante

- La variable BOP fue la única variable incorporada al modelo como significativa, existiendo una relación directa entre el incremento de los valores de BOP y de fibrinógeno.

6.2 ESTUDIO EXPERIMENTAL. RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL

Los 70 pacientes con EP fueron sometidos a tratamiento periodontal no quirúrgico. De los 70 pacientes, 25 recibieron un tratamiento coadyuvante mediante la aplicación de doxiciclina tópica en las bolsas periodontales, además del desbridamiento mecánico periodontal, diferenciándose de este modo dos grupos de pacientes: sin doxiciclina (n=45) y grupo DOX (n=25). Por lo que, en esta sección de resultados, se estudió la respuesta al tratamiento periodontal no quirúrgico, comparando entre grupos DOX y control y comparando también la respuesta por grupos según severidad de la enfermedad. Se analizaron los cambios en las variables clínicas periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo a los 3 meses del tratamiento periodontal no quirúrgico.

6.2.1 Homogeneidad de los grupos DOX y control

En un primer lugar, se realizó el análisis de homogeneidad de los grupos DOX y control respecto a todas las variables estudiadas a nivel basal, las cuales pueden actuar como elementos de confusión a la hora de valorar los efectos de la aplicación de la doxiciclina. Se compararon ambos grupos DOX y control a nivel basal respecto a las variables de perfil, estadio de EP, los parámetros periodontales, parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo.

Variables de perfil y hábitos

Respecto a las variables de perfil (Tabla 14) se observó que ambos grupos de pacientes DOX y control eran homogéneos en cuanto al sexo, siendo aproximadamente el 60% mujeres en ambos grupos. En cuanto a la edad, tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, siendo la mayoría de los pacientes mayores de 50 años. No se observaron tampoco diferencias en cuanto a la incidencia de DM, únicamente el 10% de los pacientes. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la severidad por estadios, presentando la mayoría de los pacientes de ambos grupos una EP severa/estadio III.

Sin embargo, se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto al hábito tabáquico ($p=0,039$), siendo la tasa de fumadores significativamente mayor en el grupo control (42,2%), que en el grupo DOX (24%).

Tabla 14. Variables de perfil de los pacientes según grupos DOX vs grupo control.

	GRUPO			p-valor
	Total	Control	DOX	
N	70	45	25	
SEXO				0,855
Hombre	27 (38,6)	17 (37,8)	10 (40,0)	
Mujer	43 (61,4)	28 (62,2)	15 (60,0)	
EDAD (años)	53,6±9,2	52,3±8,9	56,0±9,4	0,113
GRUPO DE EDAD				0,396
<50 años	23 (32,9)	16 (35,6)	7 (28,0)	
50-59 años	26 (37,1)	18 (40,0)	8 (32,0)	
≥60 años	21 (30,0)	11 (24,4)	10 (40,0)	
DIABETES				0,694
No	63 (90,0)	41 (91,1)	22 (88,0)	
Sí	7 (10,0)	4 (8,9)	3 (12,0)	
TABAQUISMO				0,039
No fuma	45 (64,3)	26 (57,8)	19 (76,0)	
<10 cig. /d	10 (14,3)	10 (22,2)	0 (0,0)	
≥10 cig. /d	15 (21,4)	9 (20,0)	6 (24,0)	
GRAVEDAD				0,080
I	2 (2,9)	2 (4,4)	0 (0,0)	
II	11 (15,7)	10 (22,2)	1 (4,0)	
III	40 (57,1)	25 (55,6)	15 (60,0)	
IV	17 (24,3)	8 (17,8)	9 (36,0)	

Los datos se expresan como n (% de casos) o como media ± desviación estándar y se analizaron mediante test Chi², test exacto de Fisher o mediante test t-Student de 2 muestras, respectivamente.

La mayoría de los pacientes se incluían en el estadio III, el cual representa una enfermedad severa, siendo el 55,6% de los pacientes del grupo control y el 60% de los pacientes del grupo DOX (Figura 6).

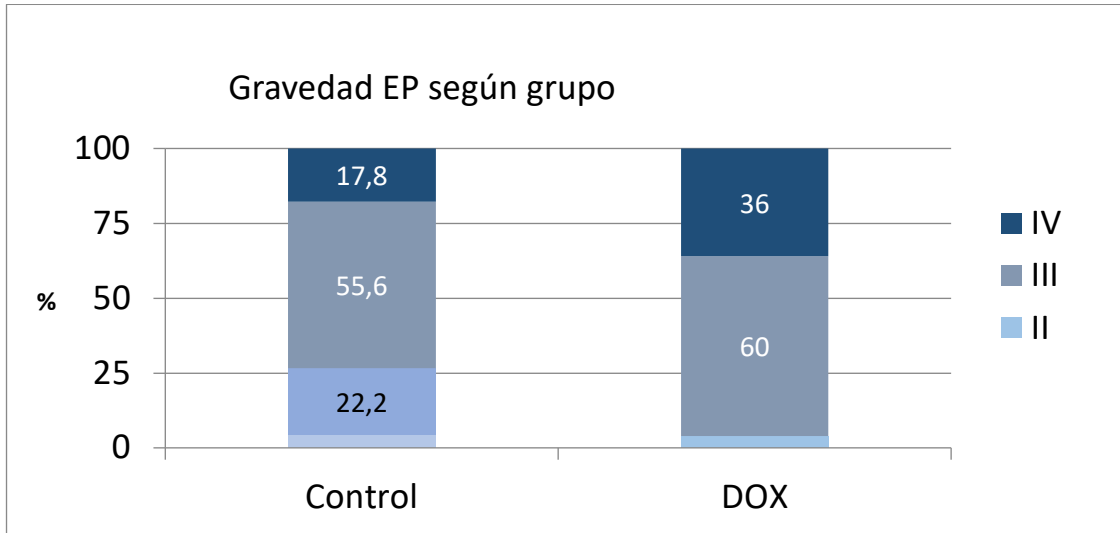


Figura 6. Distribución de los pacientes de ambos grupos según estadio.

Los resultados se expresan como %.

Parámetros periodontales

Se compararon ambos grupos DOX y control respecto a las variables clínicas periodontales a nivel basal (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros periodontales a nivel basal (t0) según grupo DOX vs grupo control.

PARÁMETROS PERIODONTALES	GRUPO			p-valor
	Total	Control	DOX	
N	70	45	25	
PS (mm)	3,32±0,76	3,06±0,69	3,78±0,66	<0,001
PIC (mm)	3,50±0,76	3,23±0,69	4,00±0,63	<0,001
nº sitios PS ≥mm	53,2±31,8	43,9±29,4	69,8±29,5	0,001
nº sitios PS ≥mm	12,7±14,0	8,58±10,9	20,1±16,1	0,003
% sitios PS ≥4mm	36,8±22,1	30,0±20,6	49,2±19,4	<0,001
% sitios PS 1-3mm	63,2±22,1	70,0±20,6	50,8±19,4	<0,001
% sitios PS 4-5mm	27,7±14,7	23,9±14,6	34,5±12,3	0,003
% sitios PS ≥6mm	9,13±9,97	6,09±8,23	14,6±10,6	0,001
IP	0,75±0,75	0,69±0,70	0,86±0,82	0,365
BOP (%)	30,9±23,4	25,9±19,4	40,1±27,5	0,014

Los datos se muestran como media ± desviación estándar y se analizaron mediante un test t-Student de muestras independientes. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas entre los grupos.

De forma generalizada, la situación periodontal es significativamente peor en los pacientes del grupo DOX, tanto en las variables dependientes del sondaje como en el índice BOP.

Parámetros inflamatorios

Se comparó a ambos grupos DOX y control respecto a las variables inflamatorias medidas en suero a nivel basal (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros inflamatorios a nivel basal (t0) según grupos DOX vs grupo control.

PARÁMETROS INFLAMATORIOS	GRUPO			
	Total	Control	DOX	p-valor
N	70	45	25	
PCRus (mg/dL)	0,29±0,30	0,30±0,34	0,27±0,21	0,642
fib (mg/dL)	351,7±76,2	345,2±78,2	363,3±72,7	0,397

Los datos se muestran como media ± desviación estándar y se analizaron mediante un test t-Student de muestras independientes. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas entre los grupos.

Parámetros de estrés oxidativo

Se comparó a ambos grupos DOX y control respecto a las variables de estrés oxidativo estudiadas a nivel basal (Tabla 17).

Tabla 17. Parámetros de estrés oxidativo a nivel basal (t0) según grupo grupo DOX vs grupo control.

ESTRÉS OXIDATIVO	GRUPO			
	Total	Control	DOX	p-valor
N	31	16	15	
MDA (µmol/L)	0,72±0,23	0,73±0,21	0,72±0,26	0,770
8-OHdG (µg/g)	9,97±6,37	10,2±8,54	9,74±2,93	0,711

Los datos se muestran como media ± desviación estándar y se analizaron mediante un test de Mann-Whitney. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas entre los grupos.

Respecto a las variables bioquímicas (parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo), no se observaron diferencias significativas entre los grupos DOX y control a nivel basal (Tablas 16 y 17).

6.2.2 Respuesta al tratamiento periodontal según grupo, DOX vs grupo control

Se analizaron los cambios en los parámetros periodontales, inflamatorios y de estrés oxidativo tras el tratamiento periodontal no quirúrgico comparando el grupo DOX y el grupo control.

Tabla 18. Parámetros periodontales en t0, t1 y diferencia t1-t0 según grupo DOX vs grupo control.

PARÁMETROS PERIODONTALES	GRUPO	T0	T1	Dif. T1-T0	p-valor T1-T0	p-valor T1-T0 entre grupos
PS (mm)	Control	3,06±0,69	2,94±0,56	-0,13±0,43	0,048	0,048
	DOX	3,78±0,66	3,41±0,68	-0,35±0,46	0,001	
PIC (mm)	Control	3,23±0,69	3,10±0,57	-0,13±0,42	0,046	0,083
	DOX	4,00±0,63	3,66±0,68	-0,33±0,48	0,003	
nº sitios PS ≥4mm	Control	43,9±29,4	38,0±24,2	-5,9±14,5	0,003	0,134
	DOX	69,8±29,5	56,8±29,1	-11,8±12,8	<0,001	
nº sitios PS ≥6mm	Control	8,58±10,9	5,11±7,98	-3,47±5,95	<0,001	0,078
	DOX	20,1±16,1	12,0±10,3	-6,79±9,48	0,002	
% sitios PS ≥4mm	Control	30,0±20,6	26,1±18,4	-3,90±9,02	0,006	0,105
	DOX	49,2±19,4	40,8±20,1	-7,68±9,22	<0,001	
% sitios PS 1-3mm	Control	70,0±20,6	72,1±20,5	2,08±14,9	0,285	0,590
	DOX	50,8±19,4	56,2±22,0	4,65±18,1	0,220	
% sitios PS 4-5mm	Control	23,9±14,6	22,1±14,7	-1,84±9,24	0,188	0,475
	DOX	34,5±12,3	31,3±13,7	-3,41±7,25	0,031	
% sitios PS ≥6mm	Control	6,09±8,23	3,92±6,17	-2,17±4,75	0,004	0,127
	DOX	14,6±10,6	9,57±8,43	-4,22±6,11	0,003	
IP	Control	0,69±0,70	0,87±0,80	0,18±0,87	0,179	0,745
	DOX	0,86±0,82	0,96±0,76	0,10±1,11	0,670	
BOP (%)	Control	25,9±19,4	19,0±18,2	-6,85±18,9	0,018	0,935
	DOX	40,1±27,5	31,2±22,4	-6,35±32,2	0,343	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. P-valor<0,05 indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una t-Student de muestras relacionadas dentro de cada grupo.

Parámetros periodontales

Se observó una mejoría después del tratamiento periodontal no quirúrgico en ambos grupos, DOX y control; en estos se redujo de forma significativa la PS, PIC, el número y porcentaje de sitios con bolsas periodontales ≥ 4 mm y ≥ 6 mm. Además, en el grupo DOX se observó una reducción significativa del porcentaje de sitios con bolsas moderadas de 4-5 mm y en el grupo control una reducción del índice BOP (Tabla 18).

Tras comparar el cambio producido en los parámetros periodontales entre ambos grupos, únicamente se observó una diferencia significativa ($p=0,048$) en el cambio producido en la PS, observándose una mayor reducción en el grupo DOX, como consecuencia del efecto de la doxiciclina tópica en las bolsas periodontales.

A continuación, se muestra la Figura 7, en la cual se compara el cambio obtenido en cada uno de los parámetros periodontales entre ambos grupos de tratamiento periodontal, DOX y control. En el grupo DOX, se observó una mayor mejoría de los parámetros periodontales que en el grupo sometido únicamente a tratamiento mecánico o grupo control. Sin embargo, si se evidenció una diferencia significativa entre ambos grupos en el cambio producido en la PS media y una tendencia a la significación entre ambos grupos en el cambio producido en la PIC y en el número de sitios con PS ≥ 6 mm.

Tabla 19. Parámetros inflamatorios en t0, t1 y diferencia t1-t0 según grupo DOX vs grupo control.

PARÁMETROS INFLAMATORIOS	GRUPO	T0	T1	Dif. T1-T0	p-valor T1-T0	p-valor T1-T0 entre grupos
PCRus (mg/dL)	Control	0,30 \pm 0,34	0,26 \pm 0,32	-0,04 \pm 0,34	0,465	0,718
	DOX	0,27 \pm 0,21	0,21 \pm 0,18	-0,06 \pm 0,17	0,074	
fib (mg/dL)	Control	345,2 \pm 78,2	339,2 \pm 68,1	-6,09 \pm 59,7	0,497	0,370
	DOX	359,3 \pm 71,5	343,5 \pm 71,1	-15,9 \pm 30,4	0,018	

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. P-valor $< 0,05$ indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una t-Student de muestras relacionadas dentro de cada grupo. Los cambios obtenidos en cada variable fueron comparados entre los grupos mediante una t-Student de muestras independientes.

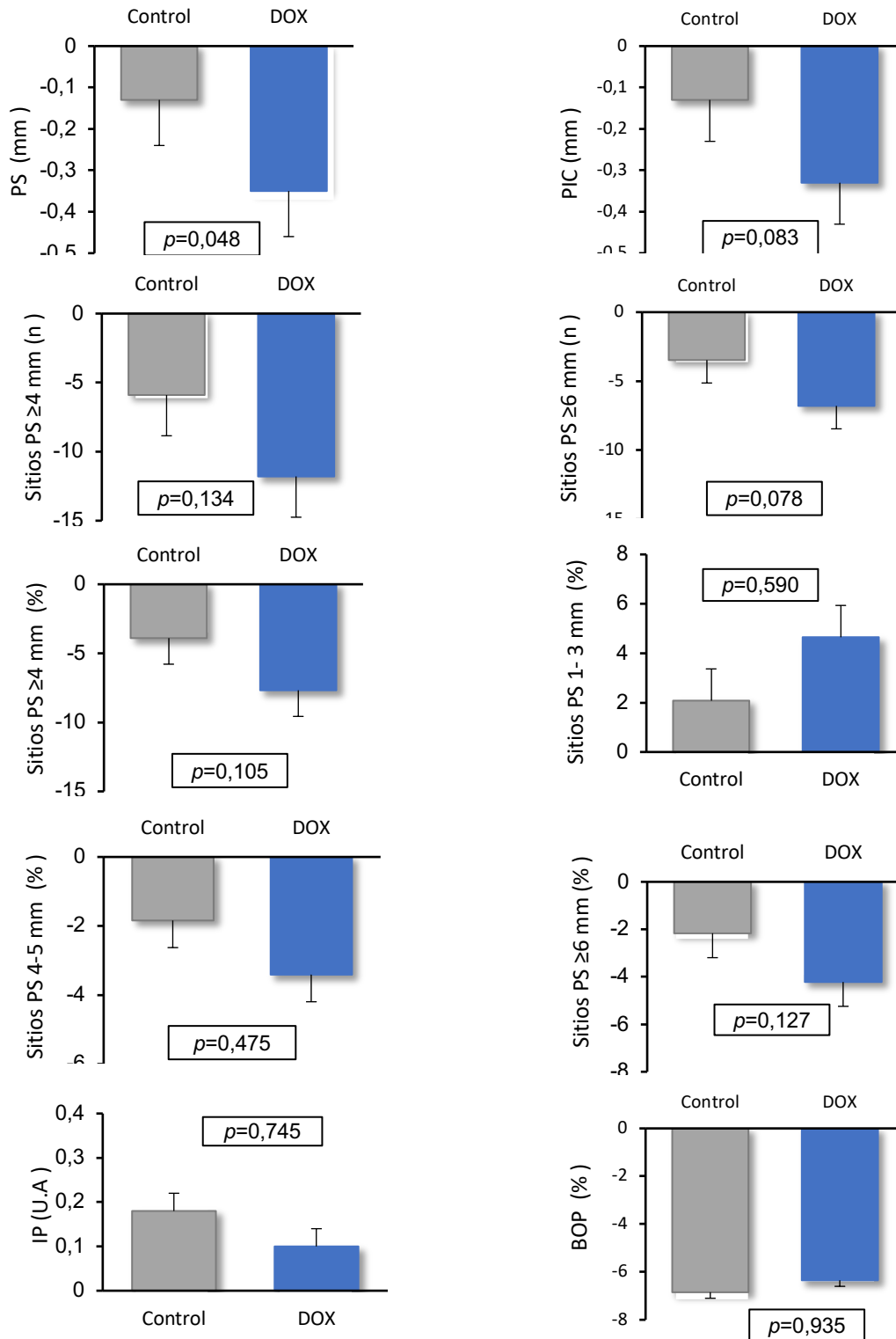


Figura 7. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros periodontales a los tres meses del tratamiento periodontal en el grupo DOX vs grupo control.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P-valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una t-Student de muestras independientes.

Parámetros inflamatorios

Únicamente se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de fibrinógeno en suero en el grupo tratado con doxiciclina tópica ($p=0,018$), según se muestra en la Tabla 19. Igualmente, se observó en dicho grupo DOX una tendencia a la significación estadística en el cambio producido en los niveles de PCRus ($p=0,074$). Sin embargo, en el grupo de tratamiento sin la aplicación de doxiciclina tópica no se observaron cambios significativos en dichos parámetros inflamatorios. Al comparar el cambio producido en ambos parámetros inflamatorios entre ambos grupos DOX y control, tampoco se observaron diferencias significativas entre ellos (Figura 8). No obstante, la doxiciclina tópica aplicada en el grupo DOX está demostrando ser beneficiosa en la reducción de los niveles séricos de fibrinógeno.

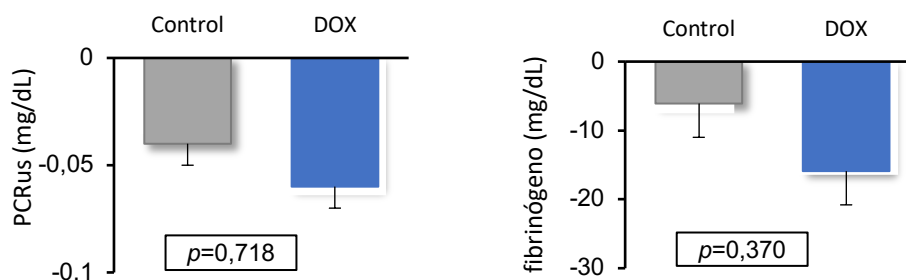


Figura 8. Cambio (diferencia t_1-t_0) de los parámetros inflamatorios a los tres meses del tratamiento periodontal en el grupo DOX vs grupo control.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P -valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una t-Student de muestras independientes.

Tabla 20. Parámetros de estrés oxidativo en t_0 , t_1 y diferencia t_1-t_0 según grupo DOX vs grupo control.

ESTRÉS OXIDATIVO	GRUPO	T0	T1	Dif. T1-T0	p -valor T1-T0	p -valor T1-T0 entre grupos
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Control	0,73 \pm 0,21	1,30 \pm 1,69	0,56 \pm 1,67	0,287	0,720
	DOX	0,72 \pm 0,26	0,91 \pm 0,47	0,17 \pm 0,49	0,245	
8OHdG ($\mu\text{g/g}$)	Control	10,2 \pm 8,54	9,22 \pm 3,95	0,59 \pm 5,75	0,909	0,462
	DOX	9,74 \pm 2,93	9,64 \pm 7,18	-0,21 \pm 7,28	0,305	

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. P -valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una t-Student de muestras relacionadas dentro de cada grupo. Los cambios obtenidos en cada variable fueron comparados entre los grupos mediante una t-Student de muestras independientes.

Parámetros de estrés oxidativo

No se observaron cambios significativos en cuanto a los parámetros prooxidantes MDA y 8-OHdG después del tratamiento periodontal no quirúrgico en ninguno de los grupos (Tabla 20). Tampoco se observaron diferencias en cuanto al cambio (T1-T0) de ambos parámetros al comparar entre los grupos DOX y control (Figura 9).

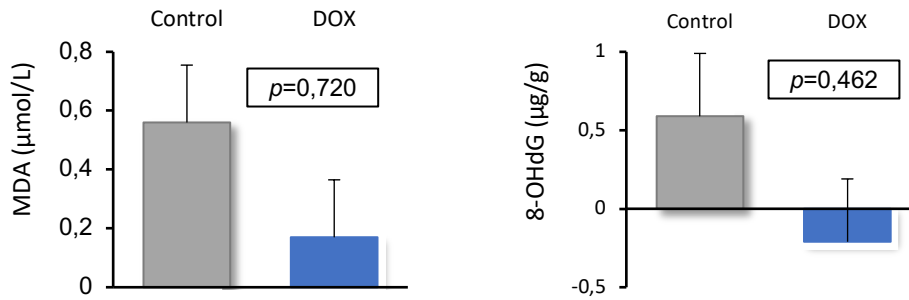


Figura 9. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros prooxidantes a los tres meses del tratamiento periodontal en el grupo DOX vs grupo control.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P -valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una t-Student de muestras independientes.

6.2.3 Respuesta al tratamiento según estadio de enfermedad periodontal en el grupo control

Parámetros periodontales

En este apartado se comparan los grupos según estadio de EP sin la influencia de la doxiciclina, donde se describen los cambios de parámetros periodontales, inflamatorios y de estrés oxidativo de T0 a T1 segmentando por nivel de gravedad.

En relación con el grupo control, en el apartado anterior se describe cómo han sido los cambios de los parámetros de T0 a T1 en el total del grupo control. Ahora se divide dicho grupo por estadios para valorar si los cambios han sido similares e independientes del nivel de gravedad de la PS. Al dividir al grupo de pacientes sometidos a tratamiento periodontal sin la aplicación de doxiciclina por estadios, únicamente se observaron diferencias significativas en el cambio producido en el número ($p=0,002$) y porcentaje de sitios ($p=0,003$) con PS ≥ 6 mm entre los grupos (Tabla 21). Dicho parámetro periodontal es el que determina estadios más avanzados, y es el que más cambia tras el

tratamiento debido a la reducción de las bolsas. Además, únicamente se observaron cambios significativos después del tratamiento periodontal en los parámetros periodontales de aquellos pacientes con una EP moderada severa (estadio III y IV).

Tabla 21. Parámetros periodontales en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.

PARÁMETROS PERIODONTALES	Estadio	T0	T1	Dif. T1-T0	p-valor T1-T0	p-valor T1-T0 entre grupos
PS (mm)	I (n=2)	2,52±0,6	2,35±0,1	-0,17±0,06	0,147	0,210
	II (n=10)	2,68±0,4	2,73±0,5	0,05±0,42	0,744	
	III(n=25)	3,05±0,6	2,92±0,5	-0,13±0,43	0,016	
	IV (n= 8)	3,73±0,7	3,40±0,6	-0,34±0,44	0,042	
PIC (mm)	I	2,68±0,2	2,52±0,1	-0,16±0,03	0,079	0,242
	II	2,82±0,38	2,85±0,4	0,03±0,41	0,834	
	III	3,20±0,63	3,08±0,5	-0,13±0,43	0,017	
	IV	9,94±0,74	3,61±0,7	-0,33±0,44	0,063	
nº sitios PS ≥4mm	I	20,0±15,6	15,5±6,4	-4,5±9,2	0,614	0,919
	II	31,2±23,6	22,7±12,9	-8,5±18,3	0,176	
	III	48,3±30,3	41,2±24,4	-7,1±12,6	0,011	
	IV	56,1±25,7	52,8±25,8	-3,4±14,9	0,541	
nº sitios PS ≥6mm	I	0	0	0	-	0,002
	II	0,6±0,7	0,8±0,9	0,20±1,2	0,619	
	III	10,7±12,2	5,7±8,5	-5,0±6,5	<0,001	
	IV	14,0±8,9	9,6±9,9	-4,4±6,4	0,095	
% sitios PS ≥4mm	I	3,11±3,5	5,06±2,4	1,96±1,01	0,223	0,408
	II	19,2±15,1	14,0±8,1	-5,2±11,5	0,191	
	III	31,4±19,4	26,6±16,3	-4,8±8,4	0,009	
	IV	45,8±20,5	44,8±19,8	-0,9±8,5	0,766	
% sitios PS 1-3mm	I	96,9±3,5	94,9±2,4	-1,95±1,01	0,223	0,238
	II	80,4±15,1	77,8±25,2	-3,04±28,1	0,741	
	III	67,7±19,3	73,3±16,6	5,6±7,6	0,003	
	IV	54,2±20,5	55,2±19,8	0,9±8,5	0,763	
% sitios PS 4-5mm	I	3,10±3,5	4,42±2,5	1,31±0,98	0,309	0,380
	II	18,8±15,3	13,5±8,1	-5,6±11,5	0,178	
	III	24,8±13,1	22,2±12,4	-2,6±8,0	0,122	
	IV	32,9±14,1	36,8±17,6	3,9±9,5	0,286	
% sitios PS ≥6mm	I	0	0	0	-	0,003
	II	0,37±0,43	0,49±0,55	0,12±0,7	0,621	
	III	6,62±8,16	4,16±6,06	-2,5±4,9	0,019	
	IV	13,1±9,07	8,27±8,47	-4,8±6,4	0,018	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. P-valor<0,05 indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una prueba de muestras relacionadas dentro de cada grupo.

Tabla 21 (cont). Parámetros periodontales en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.

PARÁMETROS PERIODONTALES	Estadio	T0	T1	Dif. T1-T0	p-valor T1-T0	p-valor T1-T0 entre grupos
IP	I	0,28±0,17	2,10±0,99	1,8±0,8	0,196	0,103
	II	0,71±0,89	0,48±0,60	-0,23±0,60	0,256	
	III	0,74±0,71	0,87±0,73	0,14±0,7	0,326	
	IV	0,64±0,56	1,03±0,98	0,39±1,2	0,397	
BOP (%)	I	22,5±10,6	15,6±0,8	-6,9±9,8	0,500	0,537
	II	2,8±20,6	11,8±10,6	-11,0±20,8	0,128	
	III	26,3±17,6	19,2±15,6	-7,1±10,3	0,002	
	IV	29,1±26,5	28,3±30,4	-0,78±34,8	0,951	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una prueba de muestras relacionadas dentro de cada grupo.

Los cambios obtenidos en cada variable fueron comparados entre los grupos mediante un test ANOVA de muestras independientes. Los cambios observados en la Tabla 21 son similares a los que presenta el grupo control y muestran en la Tabla 18, por lo tanto, los cambios están en función del nivel de gravedad. En el grupo de estadio III donde se observan más cambios, probablemente debido a que el tamaño muestral de este grupo es mayor que en el resto. El resultado es consistente, ya que cuanto mayor es la gravedad de la enfermedad (se tiene un mayor porcentaje de bolsas ≥ 6 mm), tanto mayor es la disminución del porcentaje de T0-T1 ($p= 0,019$ en estadio III y $p= 0,018$ en estadio IV).

A continuación, se muestra una figura en la cual se compara el cambio obtenido en cada uno de los parámetros periodontales según estadios (Figura 10).

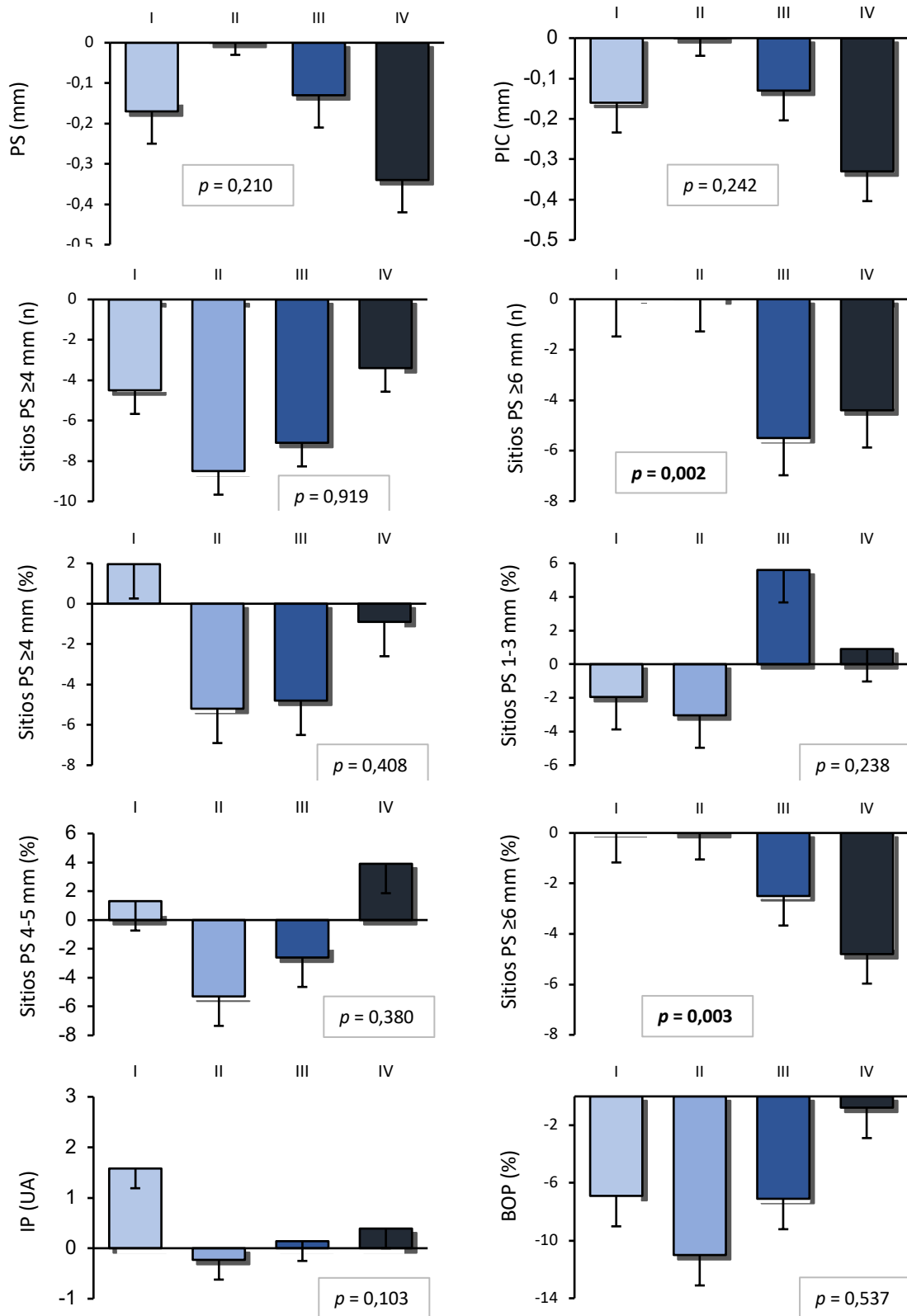


Figura 10. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros periodontales a los tres meses del tratamiento periodontal por estadio, grupo control.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una ANOVA de muestras independientes.

Tabla 22. Parámetros inflamatorios en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio grupo control.

PARAMETROS					p-valor	p-valor T1-T0 entre grupos
INFLAMATORIOS	GRUPO	T0	T1	Dif. T1-T0	T1-T0	
PCRus (mg/dL)	I (n=2)	0,3±0,14	0,45±0,1	0,015±0,01	0,205	0,071
	II (n=10)	0,20±0,15	0,21±0,21	0,013±0,11	0,725	
	III(n=25)	0,25±0,27	0,28±0,34	0,029±0,35	0,682	
	IV (n= 8)	0,66±0,49	0,34±0,38	-0,32±0,41	0,050	
fib (mg/dL)	I (n=2)	322,5±54,4	334,0±28,3	11,5±26,2	0,646	0,034
	II (n=10)	324,1±64,3	336,7±65,5	12,6±47,4	0,423	
	III(n=25)	336,4±75,3	338,8±73,7	2,4±58,6	0,840	
	IV (n= 8)	404,9±89,9	344,5±69,8	-60,4±58,4	0,022	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. P-valor < 0,05 indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una prueba de muestras relacionadas dentro de cada grupo. Los cambios obtenidos en cada variable fueron comparados entre los grupos mediante un test ANOVA de muestras independientes.

Parámetros inflamatorios

Al dividir al grupo control por estadios, se observó únicamente una reducción significativa en los niveles séricos de PCRus y fibrinógeno después del tratamiento periodontal no quirúrgico en los pacientes con estadio IV. No se apreciaron cambios de dichos parámetros en estadios más leves de EP (Tabla 22). En la Figura 11 se muestra el cambio producido en los parámetros inflamatorios después del tratamiento periodontal según el estadio de gravedad.

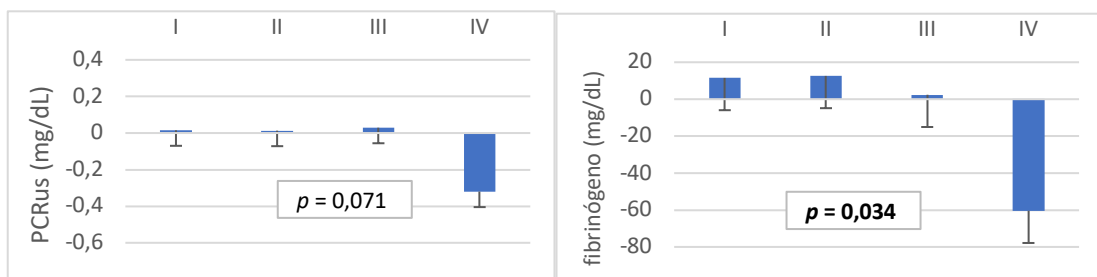


Figura 11. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros inflamatorios a los tres meses del tratamiento periodontal por estadio, grupo control.

Los resultados se expresan como media ± error estándar. P-valor<0,05 indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una ANOVA de muestras independientes.

Tabla 23. Parámetros de estrés oxidativo en t0, t1 y diferencia t1-t0 según estadio, grupo control.

ESTRÉS OXIDATIVO					p-valor T1-T0	p-valor T1-T0 entre grupos
GRUPO	T0	T1	Dif. T1-T0			
MDA (μmol/L)	I (n=0)	-	-	-	-	
	II (n=2)	0,65±0,21	1,30±0,14	0,65±0,07	0,049	0,774
	III(n=6)	0,77±0,22	1,67±2,5	0,90±2,52	0,421	
	IV(n=5)	0,74±0,23	0,86±0,30	0,12±0,23	0,305	
8OHdG (μg/g)	I (n=0)	-	-	-	-	
8OHdG (μg/g)	II (n=2)	14,7±1,2	10,7±3,9	-4,0±5,1	0,467	0,259
	III(n=6)	7,32±4,2	7,12±3,39	-0,2±5,7	0,935	
	IV(n=4)	7,58±2,01	11,7±3,85	4,1±5,2	0,212	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. *P*-valor < 0,05 indica diferencias significativas cuando se comparan T1-T0 mediante una prueba de muestras relacionadas dentro de cada grupo. Los cambios obtenidos en cada variable fueron comparados entre los grupos mediante un test ANOVA de muestras independientes.

Parámetros prooxidantes

Al igual que se ha ido observando a lo largo del análisis de resultados, se reportó un ligero aumento de los niveles séricos de MDA después del tratamiento periodontal, aunque dicho aumento no llega a ser estadísticamente significativo. No obstante, al analizar por estadio de EP se observó un cambio significativo en los pacientes con estadio II ($p=0,049$), pero dicha significación no tiene ninguna potencia estadística debido a que el análisis sólo se obtuvo de dos pacientes con estadio II. Este ligero aumento observado en los niveles de MDA en suero después del tratamiento periodontal podría ser debido al desencadenamiento de un proceso inflamatorio como consecuencia del trauma operatorio tras realizar el desbridamiento periodontal (Tabla 23). Por otro lado, los niveles en orina de 8-OHdG por lo general, muestran un ligero descenso después del tratamiento periodontal, aunque dicho cambio no resulta ser estadísticamente significativo. La ambigüedad obtenida en los parámetros de estrés oxidativo es debido al reducido tamaño muestral en el cual se ha realizado el análisis de dichos parámetros.

En la siguiente figura se muestra el cambio producido en los parámetros de estrés oxidativo en cada grupo según estadio (Figura 12).

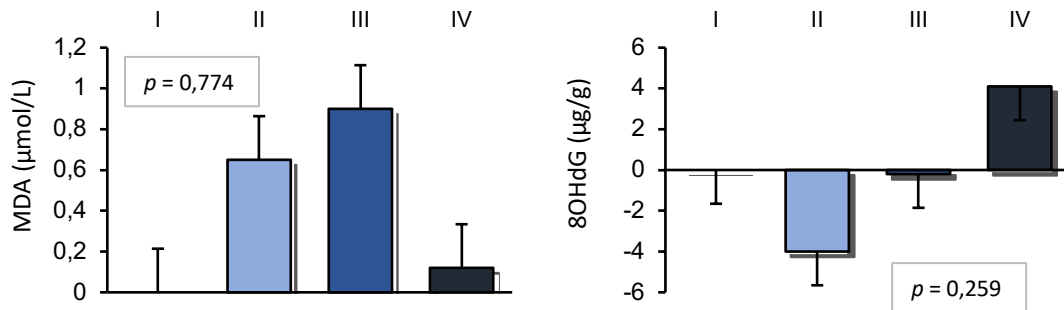


Figura 12. Cambio (diferencia t1-t0) de los parámetros de estrés oxidativo a los tres meses del tratamiento periodontal por estadios, grupo control.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. P -valor $<0,05$ indica diferencias significativas cuando los grupos fueron comparados mediante una ANOVA de muestras independientes.

M

6.2.4 Correlaciones después del tratamiento periodontal no quirúrgico

En este apartado se analizaron las correlaciones con las variables periodontales, inflamatorias y de estrés oxidativo después de los tres meses del tratamiento periodontal (T1) en el total de la población, así como segmentando a la población de los grupos DOX y control.

Parámetros periodontales

Al correlacionar las variables de los tres meses postratamiento (T1) en el total de la población se observó una correlación positiva de los niveles séricos de PCRus y de fibrinógeno con la PS, PIC, número y porcentaje de sitios con PS ≥ 4 mm y con el porcentaje de sitios con PS 4-5 mm, y una correlación negativa con el porcentaje de sitios con PS 1-3 mm. Además, los niveles de PCRus también se correlacionaron positivamente con el porcentaje de sitios con PS ≥ 6 mm y con el IP. A los tres meses del tratamiento periodontal, además también se observó una fuerte tendencia a la significación en la correlación entre los niveles de 8-OHdG y el índice BOP siendo $r=0,322$ y $p=0,055$ (Tabla 24).

Tabla 24. Correlación de los parámetros periodontales con los parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento (t1) en la población total.

POSTRATAMIENTO (T1)	PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
	r	p	r	p	r	p	r	p
PS	0,278	0,010	0,217	0,037	0,035	0,431	-0,199	0,165
PIC	0,304	0,006	0,215	0,038	0,011	0,477	-0,117	0,285
Nº sitios con PS≥4mm	0,213	0,040	0,214	0,039	0,074	0,357	-0,136	0,255
Nº sitios con PS≥6mm	0,159	0,097	0,133	0,138	-0,113	0,287	-0,169	0,205
% sitios con PS≥4mm	0,271	0,012	0,238	0,024	-0,002	0,496	-0,109	0,298
% sitios con PS 1-3mm	-0,290	0,008	-0,225	0,032	-0,038	0,426	-0,119	0,281
% sitios con PS 4-5mm	0,240	0,024	0,207	0,044	0,113	0,287	-0,098	0,318
% sitios con PS≥6mm	0,210	0,041	0,180	0,070	-0,092	0,324	-0,101	0,312
IP	0,211	0,041	0,050	0,341	0,078	0,349	0,276	0,086
BOP	0,014	0,455	0,034	0,391	0,056	0,391	0,322	0,055

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor<0,05 indica correlación estadísticamente significativa.

Parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo

Al igual que se ha realizado en la primera parte de resultados, después del tratamiento (T1) también se correlacionaron los parámetros inflamatorios con los parámetros de estrés oxidativo y también se observó únicamente una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles séricos de PCRus y de fibrinógeno. Además, a los tres meses del tratamiento periodontal también se observó una fuerte tendencia a la significación estadística en la correlación entre los niveles séricos de fibrinógeno y de MDA, siendo la $r=0,300$ y la $p=0,064$ (Tabla 25).

Tabla 25. Correlación entre parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento periodontal (t1) en la población total.

POSTRATAMIENTO (T1)	PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
	r	p	r	p	r	p	r	p
PCRus								
Fib	0,681	<0,001						
MDA	0,154	0,221	0,300	0,064				
8-OHdG	0,257	0,103	-0,66	0,374	0,170	0,204		

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor <0,05 indica correlación estadísticamente significativa.

A continuación, como existe el factor de confusión doxiciclina, se repitieron los análisis de correlación entre los parámetros periodontales, inflamatorios y de estrés oxidativo a los 3 meses del tratamiento periodontal segmentando a la población según grupos DOX y control (Tablas 26 y 27).

Tabla 26. Correlación de los parámetros periodontales con los parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento periodontal (t1) según grupo DOX vs grupo control.

POSTRATAMIENTO (T1)		PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
		r	p	r	p	r	p	r	p
PS	Control	0,258	0,044	0,230	0,064	0,201	0,255	0,100	0,379
	DOX	0,445	0,015	0,317	0,066	-0,068	0,409	-0,280	0,166
PIC	Control	0,264	0,040	0,233	0,062	0,204	0,252	0,130	0,344
	DOX	0,500	0,006	0,322	0,063	-0,111	0,352	-0,176	0,274
Nº sitios PS≥4mm	Control	0,267	0,038	0,279	0,032	0,156	0,306	0,158	0,312
	DOX	0,076	0,362	0,063	0,384	-0,048	0,435	-0,243	0,202
Nº sitios PS≥6mm	Control	0,159	0,148	0,106	0,245	-0,189	0,269	-0,031	0,462
	DOX	0,035	0,436	0,200	0,175	0,135	0,323	-0,309	0,142
% sitios PS≥4mm	Control	0,312	0,018	0,295	0,025	0,048	0,438	0,193	0,274
	DOX	0,186	0,192	0,169	0,215	-0,132	0,327	-0,260	0,185
% sitios PS 1-3mm	Control	-0,390	0,004	-0,331	0,013	-0,232	0,223	-0,487	0,054
	DOX	-0,023	0,457	-0,222	0,459	0,292	0,155	0,150	0,305
% sitios PS 4-5mm	Control	0,278	0,032	0,268	0,037	0,105	0,367	0,123	0,352
	DOX	0,099	0,322	0,097	0,327	-0,058	0,422	-0,268	0,177
% sitios PS≥6mm	Control	0,198	0,096	0,161	0,146	-0,101	0,372	0,070	0,414
	DOX	0,207	0,166	0,283	0,090	0,047	0,437	-0,172	0,279
IP	Control	0,202	0,092	0,128	0,200	0,197	0,260	0,388	0,107
	DOX	0,227	0,144	-0,159	0,229	-0,055	0,426	0,309	0,141
BOP	Control	0,043	0,389	0,067	0,330	0,009	0,489	0,372	0,117
	DOX	0,027	0,449	-0,059	0,392	0,058	0,422	0,563	0,018

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor <0,05 indica correlación estadísticamente significativa.

Al analizar las correlaciones segmentando a la población según grupos DOX y control, se observó una correlación positiva de los niveles de PCRus con PS y PIC en ambos grupos. Además, en el grupo control se observó también correlación positiva de los niveles séricos de PCRus y fibrinógeno con el número y porcentaje de sitios con PS ≥ 4 mm, con el porcentaje de sitios con PS 4-5 mm y una correlación negativa con el porcentaje de sitios con PS 1-3mm, al igual que en la muestra total, y no se observan dichas correlaciones en el grupo DOX, probablemente debido a que el tamaño muestral del grupo control es mayor ($n=45$) que en el grupo DOX ($n=24$). Por otro lado, se observó una correlación entre los niveles de 8-OHdG en orina y el índice BOP ($r=0,563$; $p=0,018$) en el grupo de pacientes con doxiciclina. Dicho hallazgo significa que a mayor índice de sangrado postratamiento periodontal, es decir, a mayor inflamación periodontal, mayores niveles del marcador prooxidante 8-OHdG en orina.

Igualmente, se analizaron las correlaciones entre los parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo a los 3 meses del tratamiento, segmentando a la población según grupos DOX y control (Tabla 26).

Tabla 27. Correlación entre parámetros inflamatorios y prooxidantes postratamiento periodontal (t1) según grupo DOX vs grupo control.

POSTRATAMIENTO (T1)		PCRus		fib		MDA		8-OHdG	
		r	p	r	p	r	p	r	p
PCRus	Control								
	DOX								
Fib	Control	0,766	<0,001						
	DOX	0,514	0,005						
MDA	Control	0,524	0,033	0,461	0,056				
	DOX	-0,288	0,159	0,163	0,289				
8-OHdG	Control	0,368	0,119	0,207	0,260	0,257	0,210		
	DOX	0,108	0,357	-0,308	0,142	0,188	0,260		

Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r). P-valor <0,05 indica correlación estadísticamente significativa.

Al analizar las correlaciones entre los parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo en cada grupo, se observó una correlación significativa entre los niveles séricos de PCRus y fibrinógeno tanto en el grupo DOX como en el grupo control, al igual que en la muestra total. Sin embargo, además se observó una nueva correlación significativa entre los niveles séricos de PCRus y MDA en el grupo control ($r=0,524$; $p=0,033$) y una fuerte tendencia a la significación estadística en la correlación de MDA con los niveles de fibrinógeno ($r=0,461$; $p=0,056$) (Tabla 27).

Dado que tres meses después del tratamiento periodontal los niveles séricos de PCRus fueron los que más se correlacionaron con los parámetros periodontales, para identificar cuáles de estas variables periodontales explicaban la correlación existente entre el estado periodontal clínico postratamiento y los niveles de PCRus se realizó un análisis de regresión lineal multivariante.

6.2.5 Regresión lineal multivariante con variables postratamiento

Se realizó un análisis de regresión lineal multivariante con los niveles de PCRus como variable dependiente y como variables independientes todas aquellas variables del estudio con las que se correlacionó (PS, PIC, número de sitios con PS ≥ 4 mm, % de sitios con PS ≥ 4 mm, % sitios con PS 1-3 mm, % sitios con PS 4-5 mm, % sitios con PS ≥ 6 mm, IP, fibrinógeno y MDA), utilizando el método por pasos (*stepwise method*), para detectar el mínimo conjunto de ellas que explica la máxima variabilidad de la PCRus (Tabla 28).

Tabla 28. Modelo de regresión multivariante de la variable postratamiento para PCRus.

Variables dependientes	Variables independientes	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	p-valor
		B	ET	β	
PCRus (T1)	fibrinógeno (T1)	0,002	0,001	0,555	0,002
	IP (T1)	0,109	0,052	0,330	0,047
	R cuadrado-correctado		0,352		
	R		0,634		
		p	0,002		

En este modelo de regresión multivariante se observó que el fibrinógeno ($\beta= 0,555$) y el IP ($\beta= 0,330$) se asociaban independientemente con los niveles séricos de PCRus en T1, explicando así el 35% de la variable dependiente. La variable IP, fue la única variable periodontal incorporada al modelo como significativa ($p=0,047$). No obstante, no tiene mucha importancia clínica, puesto que el IP no es una variable dependiente del sondaje sino más bien depende del hábito de higiene bucal del paciente.

Resumen de resultados referente al estudio experimental:

1. Respuesta al tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes del grupo DOX vs pacientes del grupo control

- Respecto a los parámetros periodontales, se observó una mejoría después del tratamiento periodontal no quirúrgico en ambos grupos DOX y control y una diferencia significativa en el cambio producido en la PS, en el grupo DOX.
- Respecto a los parámetros inflamatorios, se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de fibrinógeno y una tendencia a la significación estadística en el cambio producido en los niveles de PCRus en suero en el grupo DOX.
- Respecto a los parámetros prooxidantes, no se observaron cambios significativos en los niveles de MDA y 8-OHdG después del tratamiento periodontal no quirúrgico en ninguno de los grupos.

2. Respuesta al tratamiento periodontal no quirúrgico según estadios en el grupo control

- Respecto a los parámetros periodontales, se observaron diferencias significativas en el cambio producido en el número y porcentaje de sitios con PS ≥ 6 mm entre los grupos por estadios III y IV.
- Respecto a los parámetros inflamatorios, al dividir al grupo control por estadios, se observa una reducción significativa en los niveles séricos de PCRus y fibrinógeno en los pacientes con estadio IV.
- Respecto a los parámetros prooxidantes, los niveles en orina de 8-OHdG por lo general, mostraron un ligero descenso, no significativo, después del tratamiento periodontal.

3. Correlaciones después del tratamiento periodontal no quirúrgico

- Respecto a los parámetros inflamatorios, se observó una correlación significativa de los niveles séricos de PCRus y de fibrinógeno en relación con las diferentes variables dependientes del sondaje y los niveles de PCRus se correlacionaron significativamente con el porcentaje de sitios con PS ≥ 6 mm y con el IP.
- Tanto en el grupo DOX como en el control, se observó una correlación significativa de los niveles de PCRus con PS y PIC.
- Respecto a los parámetros prooxidantes, se observó una fuerte tendencia a la significación en la correlación entre los niveles de 8-OHdG y el índice BOP, cuando consideramos la población total, mientras que, una correlación es significativa en el grupo DOX cuando se comparan los grupos DOX y control.
- Se observó una fuerte tendencia a la significación estadística en la correlación entre los niveles séricos de fibrinógeno y de MDA.

4. Regresión lineal multivariante con variables postratamiento

- El fibrinógeno se asocia independientemente con los niveles séricos de PCRus.

7. DISCUSIÓN

7.1 ASOCIACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA

La relación entre las infecciones orales y ciertas alteraciones sistémicas ha sido mencionada a lo largo de la historia por autores como Benjamín Rush en el siglo XVIII⁸⁸, por William Hunter⁸⁸ en el año 1910, por Sanz y cols. (1989)⁸⁹ y más recientemente, por Steven Offenbacher (1986)⁹⁰, quien propuso el nacimiento de la ya mencionada “medicina periodontal”.

La asociación entre la EP y la inflamación sistémica ha sido y sigue siendo en este momento objeto de controversia, sobre todo como factor de riesgo cardiovascular. Existen publicaciones como las de Matthews y cols. (2007)²¹⁶, que ponen de manifiesto dicha asociación¹⁶⁵. Por lo tanto; la EP, los niveles de homocisteína, de fibrinógeno, la elevación de los niveles de PAI-1 o de PCRus pasan a formar parte de los llamados factores de riesgo cardiovascular emergentes^{172,175}. Los denominados criterios de Framingham¹⁶⁴, como la edad, el tabaquismo, las dislipemias, diabetes y la hipertensión arterial, han resultado claramente insuficientes como predictores, ya que hasta el 20% de los eventos coronarios no guardan relación con los mencionados factores de riesgo clásicos, como ponen de manifiesto los estudios de Szwed y cols. (2021)²¹⁷, Hamza y cols. (2021)²¹⁸. Asimismo, hay pacientes con múltiples factores que no desarrollarán nunca la enfermedad^{161,164}.

Es precisamente en estos grupos de riesgo intermedio en los que incorporar la determinación de la PCRus puede ser de gran utilidad en la mejora de la predicción, tal y como indican los trabajos de Preethi y cols. (2019)²¹⁹, Chia y cols. (2020)²²⁰. Esto es porque la PCRus representa una medición indirecta de la función endotelial^{116,136-138}, cuya alteración, denominada disfunción endotelial, está considerada como la etapa inicial del proceso arteriosclerótico, tal y como apreciaron los resultados experimentales obtenidos por Balamir y cols. (2018)²²¹, Maio y cols. (2021)²²².

Los primeros artículos publicados a tal efecto por Saikku y cols. (1988)¹¹⁶, ya vinculaban las infecciones bacterianas con las coronariopatías. La EP aparece relacionada, en múltiples trabajos, con los procesos arterioscleróticos, los cuales muestran un aumento en los niveles plasmáticos de marcadores y citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-6, PCR^{22,118,129-131,173,175} y fibrinógeno^{179,181}. Por otra parte, aparecen estudios donde se relaciona la aparición de bacteriemias tras el raspado y alisado radicular, extracciones dentales o el cepillado^{119,120}.

En esta misma línea, estudios previos anatomopatológicos y arteriográficos de lesiones ateromatosas evidenciaron la presencia en las mismas de patógenos periodontales, que llegan incluso a penetrar la capa muscular¹²¹⁻¹²⁴ y que las formas severas se asocian a lesiones arteriales más extensas, dada la capacidad que poseen las VLDL, dado que aumentan sus niveles, con objeto de neutralizar los LPS bacterianos y con ellas el incremento de la capacidad proaterogénica del plasma^{125,155}. Igualmente, la elevación de los anticuerpos circulantes frente a patógenos periodontales se ha asociado con un riesgo aumentado de infarto de miocardio¹²⁶, y la carga bacteriana ha sido relacionada con el aumento ecográfico del espesor de la pared aórtica^{127,128}, mostrando, de esta forma, que la carga antigénica frente a patógenos periodontales presenta igualmente unas características proaterogénicas. Contrariamente a lo señalado, otros estudios, como los de Syrjansen y cols. (1990)¹⁹⁶, suponen que la mencionada asociación no es causal y que se debe únicamente a la existencia de factores de riesgo comunes, ya que solo encontraron elevaciones de la PCRus en algunos individuos¹⁷⁶, o que los individuos afectados de EP presentaron los mismos niveles de PCRus que los individuos edéntulos^{171,175,177,178}.

En relación con los factores de riesgo y la influencia de las variables de perfil de los pacientes, estudios previos consideraron la edad como factor determinante en el desarrollo y exacerbación de una EP preexistente, como consecuencia del deterioro anatómico o funcional del periodonto⁵⁴⁻⁵⁶. En el presente estudio, se observa que influye significativamente ($p=0,042$) en el diagnóstico de una EP grado IV. Concretamente, por cada año adicional, el riesgo de una afectación de estadio IV se eleva un 7%.

Similares experiencias se realizaron con respecto a la influencia del sexo y mostrando resultados muy diversos, ya unas ponen de manifiesto que estadísticamente los hombres parecen tener más riesgo de EP, apreciando que un varón multiplica por más de cuatro el riesgo de estadio III-IV respecto a una mujer, hecho que se atribuyó a una higiene y hábitos distintos a los de la mujer. Contrariamente a lo señalado, en otros parece que las fluctuaciones hormonales hacen más proclive a la mujer. Otros estudios reportan que el sexo parece no influir, según ponen de manifiesto en sus publicaciones Aljehani y cols. (2014)²²³, Genco y cols. (2013)²²⁴.

Existen multitud de trabajos sobre el papel del tabaco en el desarrollo de la EP, así como con la extensión y gravedad de la misma, ya que los Al-Ghamdi y cols. (2007)¹⁹, Haffajee y cols. (2001)²⁰ Estos resultados son coincidentes con las observaciones de Al-Ghamdi y cols. (2007)¹⁹, Haffajee y cols. (2001)²⁰, quienes encontraron que se acompañan de una disminución de los PMN y de un aumento de la producción de IL-6 e IL-8 por parte de los neutrófilos¹⁹. El presente estudio mostró que todas las variables clínicas relacionadas con el sondaje estuvieron en peor situación en el grupo de fumadores, con respecto al grupo de los no fumadores, en los casos con cig. ≤ 10 /día mostrando significación estadística ($p=0,004$) para los estadios III-IV, siendo menor para los casos con cig. >10 /día. No obstante, y dado que la EP se presenta tanto en fumadores como en no fumadores, el tabaco agravaría la enfermedad ya establecida, luego es un indicador independiente de riesgo del resto de los factores etiopatogénicos. Este hecho se evidencia dada la disminución de la significación en los casos con PS > 6 mm ($p=0.064$).

La relación entre la EP y la DM aparece muy bien documentada en la literatura, y se manifiesta de forma bidireccional. Así, una diabetes mal controlada se asocia a una mayor afectación periodontal^{96,98,106}, e igualmente la mejoría del estado periodontal tras el tratamiento da lugar a un mejor control metabólico, según comprobaron experimentalmente Aldridge y cols. (1995)²²⁵. Los mecanismos de afectación periodontal suponen, entre otros, la activación del sistema monocito-macrófago, el cual posee receptores (RAGES) para los productos finales de glicación (AGES), mecanismo que propusieron Nishimura y cols. (1996)¹⁰¹ en su estudio y cuya interacción da lugar a la síntesis aumentada de ROS, citocinas proinflamatorias en las células endoteliales y

fenómenos trombóticos locales, mediados por mecanismos de adhesión vascular vía ICAM-1 y VCAM-1¹⁰¹.

En la línea de estos trabajos de investigación se encuentran otros sobre la influencia de la resistencia insulínica (RI) y su asociación con la EP, como los de Benguigui y cols. (2010)²²⁶, Song y cols. (2016)²²⁷, Demmer y cols. (2012)²²⁸, Islam y cols. (2015)²²⁹, los cuales pusieron de manifiesto que los parámetros clínicos de los pacientes diabéticos muestran una mayor extensión y gravedad como puso de manifiesto el artículo de Porwal y cols. (2015)²³⁰. No obstante, y dado que la enfermedad aparece igualmente en pacientes no diabéticos y sin RI, se puede afirmar que la DM exacerbaría la enfermedad ya establecida. En el presente trabajo, se determinó que padecer DM multiplica por 2,63 el riesgo de tener una EP estadio IV. Este hecho pone de manifiesto la relación entre la DM y la inflamación sistémica y, aunque carente de significación estadística, va parcialmente en la línea de lo anteriormente señalado. Así, en los pacientes diabéticos se observó una mayor extensión de la enfermedad y, en consonancia con lo mostrado por otros estudios^{226,230}, un aumento de la actividad inflamatoria local con respecto a los no diabéticos, que relaciona la DM con una mayor gravedad de la enfermedad. Algunos autores que siguieron esta línea de investigación fueron D'Áiuto y cols. (2008)²³¹.

Con respecto a la relación entre la EP y los marcadores de inflamación sistémica, Gani y cols. (2009)¹³⁰, Vidal y cols. (2009)¹³⁴, ponen de manifiesto un incremento de los niveles séricos de marcadores inflamatorios como consecuencia de la repercusión sistémica del proceso local, que constituye la EP y la reducción de los mismos tras el tratamiento periodontal no quirúrgico y cuyos efectos han sido estudiados por Cecoro y cols. (2020)²³² y por Radafshar y cols. (2010)²³³, en lo que se ha denominado “inflamación sistémica de bajo grado”. Como indican Vidal y cols. (2009)¹³⁴, la influencia de la edad en los niveles séricos de PCRus, como consecuencia del aumento del impacto de las patologías subclínicas, puede ser un factor de confusión y su influencia puede ser mayor a medida que esta se incrementa.

Los resultados obtenidos sobre las relaciones entre las variables clínicas periodontales y las proinflamatorias mostraron, por una parte, que la PCRus presentó una relación significativa con el PIC, y el fibrinógeno con las distintas variables clínicas dependientes del sondaje, en particular con el índice BOP ($p=0,007$). Los niveles de los marcadores inflamatorios, según los distintos estadios, mostraron que concentraciones séricas superiores de PCRus se encuentran igualmente en los estadios de mayor gravedad mostrando significación ($p=0,018$) y poniendo así de manifiesto la influencia de la extensión de la enfermedad en el incremento de la actividad inflamatoria sistémica. Igualmente, se determinó que cada año adicional aumenta el riesgo de alterar la PCRus en un 3%, y que solo la edad influye significativamente en el diagnóstico de una EP grado IV.

A la disparidad de resultados que muestran los diversos estudios puede contribuir tanto la heterogeneidad de las poblaciones objeto del estudio, como la influencia de los factores de confusión y de perfil del paciente mencionados anteriormente, entre estos cabría destacar la edad, el sexo, y, por su alta prevalencia, el tabaquismo y la DM. Algunos estudios, como los de Dikshit y cols. (2015)²³⁴, Albush y cols. (2013)²³⁵, entre otros¹³⁴, determinan igualmente la relación entre los niveles séricos de fibrinógeno y la EP, observándose un paralelismo entre los citados niveles y el progreso de la enfermedad.

En el presente trabajo, y en línea con los estudios anteriores, se pone de manifiesto cómo los valores de fibrinógeno se incrementan a medida que lo hace el estadio, mostrando dicha asociación tendencia a la significación estadística ($p=0,055$). Los niveles séricos de fibrinógeno evidencian, igualmente, un paralelismo con la gravedad. Del mismo modo, los niveles de fibrinógeno se relacionan significativamente con las distintas variables periodontales dependientes del sondaje, con la PCRus y fundamentalmente con el BOP, siendo esta última la única variable significativa incorporada al modelo regresión multivariante ($p=0,015$). Por lo tanto, se puede afirmar que los niveles séricos de fibrinógeno, como expresión de la carga inflamatoria, reflejan la repercusión sistémica de la inflamación local.

En resumen, y en términos generales, el fibrinógeno muestra a lo largo del presente estudio un grado de correlación menor, pero próximo a la significación, con los estadios periodontales de gravedad ($p=0,055$), que la PCRus ($p=0,018$).

Estudios previos, como los llevados a cabo por Baima y cols. (2021)²³⁶, Cherian y cols. (2019)²³⁷, Keserwala y cols. (2016)²³⁸, Muthuraj y cols. (2017)²³⁹, Bensal y cols. (2017)²⁴⁰, entre otros^{189,193}, analizan los marcadores relacionados con el estrés oxidativo como el MDA, 8-OHdG, y el 8-isoprostano vinculados con la EP y su respuesta al tratamiento periodontal. La mayoría de estos estudios han evaluado el estrés oxidativo a través de la carga global de ROS y MDA en suero¹⁹². Otros trabajos, como los de Guarnieri y cols. (1991)²⁴¹, Altingöz y cols. (2020)²⁴², Varghese y cols. (2020)²⁴³, Anusuya y cols. (2017)²⁴⁴, entre otros^{188,189}, determinaron los biomarcadores derivados de guanina en saliva y líquido crevicular gingival.

En el presente estudio, se evaluó la fluctuación de los niveles en sangre periférica de MDA y como novedad, en investigaciones referidas a la periodoncia, determinaciones en orina de 8-OHdG. Los dos marcadores que se expresan más comúnmente en el daño oxidativo sistémico asociado con la EP y basados en los estudios de varios autores, como son las publicaciones de Kirkpatrick y cols. (1996)²⁴⁵, Liu y cols. (2003)²⁴⁶, Kouda y cols. (2001)²⁴⁷, Kadiiska y cols. (2005)²⁴⁸, Jaruga y cols. (1996)²⁴⁹, Guyton y cols. (1993)²⁵⁰, Cadet y cols. (1998)²⁵¹, Schmerold y cols. (2001)²⁵², entre otros¹⁸⁶.

El MDA, dentro de la vía lipídica, tiene un papel importante en la función endotelial de los pacientes con EP y en el posible desarrollo de enfermedad coronaria¹⁸⁸. Estudios recientes sobre la relación entre la enfermedad y el estrés oxidativo encontraron un aumento significativo de los niveles de MDA en la saliva y el líquido crevicular gingival de los pacientes, en comparación con un grupo control sin enfermedad¹⁵⁸. Sin embargo, en la citada revisión no se recopilaron datos sobre los niveles de MDA en suero.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre los niveles de MDA en muestras de suero, para evidenciar la posible repercusión sistémica de la LPO, no se pudieron determinar si los pacientes con EP presentaron unos niveles séricos más elevados, ya que no se

dispuso de un grupo control. Sí se pudo observar, entre los diferentes grupos segmentado por estadios, una tendencia en el aumento de los citados niveles a medida que progresa la enfermedad y la gravedad se incrementa, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. En línea con el presente trabajo, los estudios previos de Chen y cols. (2019)²⁵³, Monje y cols. (2014)²⁵⁴, si bien, mostraron niveles más altos de MDA en saliva en pacientes con EP, así como una correlación significativa de estos niveles en saliva con los parámetros periodontales, no se observó tal asociación entre los citados parámetros y los niveles en suero.

Investigaciones presentadas por Varadan y cols. (2019)²⁵⁵ muestran para el BOP una correlación positiva moderada con los niveles séricos de MDA. El sangrado gingival al sondaje es un signo de inflamación local y destrucción periodontal, y por lo tanto puede aumentar los niveles sistémicos de los marcadores tanto inflamatorios, como de daño oxidativo. Experimentalmente, se observó la falta de asociación significativa entre los niveles séricos de MDA con los parámetros periodontales, incluido el BOP. Este resultado puede deberse al tamaño de la muestra, ya que fue evaluado en un pequeño grupo representativo de la población.

La modificación oxidativa más frecuente del ADN suele ocurrir a nivel de las bases nitrogenadas, entre las que destaca la guanina, produciendo 8-OHdG. Los niveles de 8-OHdG como indicador del daño oxidativo del ADN han sido estudiados por Fraga y cols. (1990)²⁵⁶ y Dubois-Deruy (2020)²⁵⁷. En los últimos años, la 8-OHdG se ha utilizado ampliamente en muchos estudios, no solo como biomarcador para la medición del daño oxidativo endógeno del ADN, sino también como factor de riesgo para multitud de condiciones patológicas según comprueban experimentalmente Kawanishi y cols. (1990)²⁵⁸. Después de la reparación del ADN, la 8-OHdG es excretada por la orina, existiendo numerosas evidencias que han puesto de manifiesto que la 8-OHdG urinaria es un biomarcador importante del estrés oxidativo sistémico según las publicaciones anteriores de Poulsen y cols. (2013)²⁵⁹, Lily y cols. (2004)²⁶⁰.

Hendek y cols. (2014)²⁶¹, Nguyen y cols. (2017)²⁶², entre otros, han detectado niveles más altos de 8-OHdG en saliva y en líquido crevicular gingival en pacientes con EP, en

comparación con los controles sanos, así como correlaciones significativas entre los niveles de 8-OHdG en saliva y los parámetros periodontales. Estos estudios revelan que la lesión del ADN y el estrés oxidativo aumenta en los tejidos de las bolsas periodontales en pacientes con enfermedad crónica^{187,189-191,243,244}, existiendo un vínculo directo entre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo locales relacionados con la EP crónica, y los niveles en saliva y fluido crevicular gingival, lo que indica el papel importante del estrés oxidativo en la aparición y el desarrollo de las lesiones en la enfermedad crónica²⁵³. Fentoğlu y cols. (2015)²⁶³, Saglam y cols. (2018)²⁶⁴ han observado, igualmente, niveles séricos más altos de 8-OHdG en pacientes con EP, en estos casos en asociación con otros estados patológicos, como hiperlipidemia o síndrome de ovario poliquístico, en comparación con pacientes sin enfermedad asociada a otra patología sistémica.

En el presente trabajo se han evaluado los niveles de 8-OHdG en orina en estos pacientes y, a diferencia de los estudios previos que han evaluado los niveles en saliva y fluido crevicular gingival, se observó una diferencia significativa entre los grupos, por severidad ($p=0,021$), siendo dicho parámetro más elevado en los estadios II, III y IV que en los pacientes con EP inicial con gravedad estadio I. No se observó, en cambio, asociación alguna con los distintos parámetros periodontales objeto de estudio.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio clínico periodontal que ha medido los niveles de 8-OHdG en orina, dado que se trata de un subproducto fruto de la reparación del ADN, con la finalidad de determinar la implicación de la EP en los estados prooxidantes sistémicos. Sin embargo, nuestro estudio tiene algunas limitaciones que deben tenerse en consideración, ya que el tamaño de la muestra no es muy grande y en la población de estudio no incluimos un grupo control de individuos sin enfermedad, y el MDA y la 8-OHdG se evaluaron en una pequeña muestra representativa de la población.

Sin duda, queda mucho por aprender sobre la asociación entre los marcadores sistémicos inflamatorios, prooxidantes y la EP en su relación con el riesgo sistémico. Por lo tanto, se requieren más estudios prospectivos en la población con EP, para evaluar la

implicación de los niveles de marcadores de estrés oxidativo a nivel sistémico, con el fin de determinar el impacto de la enfermedad en la fisiopatología de la inflamación sistémica de bajo grado.

7.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO QUIRÚRGICO

El tratamiento periodontal no quirúrgico sigue siendo el tratamiento de base de la EP crónica, cuyo objetivo principal es la remoción mecánica de la placa y cálculo mediante el RAR, con la consiguiente reducción o eliminación de la bolsa, facilitando la higiene oral y mejorando por lo tanto la inflamación y sangrado de los tejidos periodontales según los estudios de Akram y cols. (2016)²⁶⁵ y Figuro y cols. (2017)²⁶⁶.

El presente estudio se trata de un ensayo clínico con características observacionales e intervencionistas con seguimiento prospectivo. Para alcanzar los objetivos, se realizó el tratamiento periodontal en una única sesión, procedimiento que recibe el nombre de *full mouth*^{106,207-209}. Esta técnica ha demostrado beneficios con respecto al tratamiento tradicional, realizado en múltiples sesiones, que muestra marcados efectos sobre los marcadores inflamatorios según los trabajos de D'Áiuto y cols. (2005)²⁶⁷, al evitar de esta manera los sucesivos episodios de reagudización ocasionados como consecuencia del trauma operatorio¹³⁴. A los tres meses del tratamiento, se realiza la reevaluación tanto de los parámetros clínicos como bioquímicos, teniendo en consideración que este es el tiempo que tarda el *biofilm* en volver a reestructurarse, periodo considerado por la mayoría de los estudios, como los de Duzagac y cols. (2016)²⁶⁸, Bouazi y cols. (2015)²⁶⁹, Khan y cols. (2021)²⁷⁰, entre otros^{207,209}.

Con objeto de maximizar los efectos del tratamiento y aumentar el conocimiento sobre los resultados, se aplicó doxiciclina tópica en las bolsas ≥ 5 mm en el 50% de la muestra total^{78,187,210,212,213}, dada la mayoritaria sensibilidad hacia las tetraciclinas de los microorganismos periodontales, hecho que ponen de manifiesto los trabajos de Genco y cols. (1994)²⁷¹, Lecio y cols. (2020)²⁷² y Trajano y cols. (2019)²⁷³.

7.2.1 Efectos del tratamiento sobre las variables clínicas periodontales

Estudios previos ponen de relieve una mejoría de los parámetros clínicos tras el tratamiento periodontal no quirúrgico^{206,209}. En línea con los resultados observados, en el presente trabajo, se evidenció una mejoría generalizada y significativa de los parámetros clínicos, con la excepción del IP, que permaneció estable. De esta forma, el número de sitios con PS ≥ 4 mm y ≥ 6 mm disminuye de forma significativa con el tratamiento, e idéntico resultado se obtiene para el porcentaje de sitios de sondaje con PS ≥ 4 mm y PS ≥ 6 mm. Igualmente, el efecto del tratamiento sobre la PS, considerando cada uno de los tres segmentos propuestos, pone de manifiesto, que en el bloque con bolsas pequeñas, PS de 1-3 mm, estas aumentan de profundidad; en el bloque con bolsas muy grandes, PS ≥ 6 mm, mejoran, disminuyendo su profundidad y el bloque intermedio muestra mayor estabilidad, ya que se nutre de los casos que pasan de los dos grupos anteriores. El comportamiento del índice BOP, sigue el patrón de las variables de sondaje, mejorando de forma significativa, y el IP es el único índice clínico que se mantiene estable, no variando entre la situación basal y la reevaluación a los tres meses.

7.2.2 Efectos del tratamiento sobre los parámetros inflamatorios

El efecto del tratamiento periodontal sobre los niveles de biomarcadores a lo largo de múltiples estudios ha sido muy heterogéneo^{135,265}. De esta forma, estudios de asociación como los de Yoshii y cols. (2009)¹³² y D'Aiuto y cols. (2005)¹³³ observan reducciones significativas de marcadores inflamatorios tras el tratamiento periodontal. Algunos estudios muestran igualmente reducciones de PAI-1, VCAM-1, MMP-9¹³⁵, PCRus^{134-137,233} y del fibrinógeno^{134,234,235}, estando todos ellos relacionados con la actividad inflamatoria.

En el presente estudio, durante la fase de reevaluación, se observó cómo los niveles de PCRus permanecieron inalterados, en la línea de otros trabajos, que tampoco encontraron alteraciones, como en los trabajos experimentales desarrollados por Al-Isa y cols. (2019)²⁷⁴, Ide y cols. (2003)²⁷⁵ y en contraposición con los estudios inicialmente referenciados. López y cols. (2009)²⁷⁶ explican estos resultados cómo consecuencia de

un exceso de carga inflamatoria sistémica, producida por la presencia de patologías subclínicas, que haría insuficiente la reducción de la inflamación consecuencia del tratamiento periodontal.

Estudios anteriores, entre los que se encuentran los de Chandy y cols. (2017)²⁷⁷, Teeuw y cols. (2014)²⁷⁸, Saffi y cols. (2013)²⁷⁹, Vidal y cols. (2013)²⁸⁰, López y cols. (2011)²⁸¹, Lopez y cols. (2012)²⁸², entre otros, que evidenciaron un descenso de los niveles de fibrinógeno después del tratamiento periodontal en pacientes con los niveles basales previamente alterados y que presentaban hipertensión arterial^{134,280} o diabetes, tal y como reportan Llambes y cols. (2012)²⁸³.

Asimismo, otros estudios mostraron resultados totalmente dispares. De esta forma, unos observaron descensos de los niveles de PCRus, pero no de fibrinógeno²³³, y en otros se observó un aumento en los niveles séricos de los productos de degradación del fibrinógeno, dímero D, como expresión de unos niveles séricos más elevados de lo normal²³⁴. Offenbacher y cols. (2009)²⁸⁴, en investigaciones efectuadas a más largo plazo, sí que observaron reducciones a los seis, nueve y 12 meses tras el tratamiento periodontal²⁸², lo que indica que los esperados descensos sí que se producen, pero más alejados de la sobrecarga inflamatoria inicial consecuencia del tratamiento.

Así pues, la EP está relacionada tanto con la inflamación local como sistémica, mostrando el tratamiento periodontal una mejoría tanto de los parámetros clínicos como de los bioquímicos. Este contribuye a demostrar que el desbridamiento periodontal mecánico es capaz de producir una disminución del índice de sangrado gingival, como expresión del descenso de la inflamación local, como consecuencia de un descenso de la carga inflamatoria sistémica, que se manifiesta en forma de una reducción de los niveles séricos de fibrinógeno.

En el presente estudio, como hallazgo fundamental, se puede señalar una reducción estadísticamente significativa de los niveles de PCRus y de fibrinógeno después de tres meses del tratamiento periodontal, y en particular de la PCRus con el porcentaje de sitios con PS ≥ 6 mm., es decir, con los estadios más avanzados de la enfermedad.

7.2.3 Efectos del tratamiento periodontal sobre los parámetros prooxidantes

La evidencia acumulada indica que la EP ya no se define únicamente como una enfermedad inducida por patógenos. Más bien, ahora se reconoce como una disbiosis, según describen en sus trabajos Chimenos-Kütner y cols. (2017)²⁸⁵, y como la consecuencia de una respuesta inmune desproporcionada y del estrés oxidativo que conduce al daño de las estructuras periodontales. Aunque las bacterias periodontopáticas inician la enfermedad, más recientemente, los estudios de Sulijaya y cols. (2019)²⁸⁶ pusieron de manifiesto que la inflamación y el estrés oxidativo son las principales causas de la gravedad de la destrucción de los tejidos.

La respuesta del sistema de defensa del huésped ante la infección bacteriana, mediado por el sistema inmunológico innato, regulará al alza los distintos mediadores inflamatorios y, como consecuencia, se producirá en los tejidos periodontales, por parte de los PMN, un exceso de ROS, que no son contrarrestadas por los sistemas de defensa antioxidantes. Como consecuencia, se van a producir daños oxidativos en las membranas, con un aumento de los metabolitos fruto de la LPO, en el ADN y en las proteínas²⁵⁹. Yiğit y cols. (2017)²⁸⁷ observaron que la regulación positiva de las ROS podría estar detrás del establecimiento y la progresión tanto de la EP como de otras enfermedades crónicas. De ahí que los tratamientos más novedosos estén basados en la utilización de sustancias con características antioxidantes.

Önder y cols. (2017)²⁸⁸ prestaron mucha importancia al efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en los niveles salivares de MDA en pacientes con EP crónica; mostraron que, si bien los niveles de MDA salivar fueron significativamente más altos en estos pacientes en comparación con el grupo control ($p < 0,001$), el tratamiento periodontal modificó de forma no significativa los niveles de MDA salivar ($p = 0,093$).

Como consecuencia, los niveles de MDA pueden asociarse con el impacto local al estrés oxidativo y la intervención clínica puede ser beneficiosa para el control del estrés oxidativo relacionado con las lesiones periodontales.

En el presente trabajo no se observaron cambios significativos en los niveles de MDA después del tratamiento periodontal no quirúrgico en relación con las diversas variables de pendientes del sondaje, pero sí se observó una fuerte tendencia a la significación estadística en la correlación entre los niveles séricos de fibrinógeno y de MDA. Este hecho pone de manifiesto la posible relación entre los marcadores de inflamación sistémica y la LPO.

En su trabajo, Dede y cols. (2012)¹⁹⁰, y más recientemente Öngöz y cols. (2016)²⁸⁹, ponen de manifiesto que las determinaciones de 8-OHdG en fluido crevicular gingival han demostrado ser más útiles como biomarcador que en saliva, ya que expresa con mayor exactitud la gravedad de la EP y los efectos del tratamiento sobre el estrés oxidativo. Otros estudios^{239,261} mostraron una reducción estadísticamente significativa tres meses después del tratamiento periodontal en comparación con los pacientes controles. Estudios en los que se determinó el impacto de la terapia periodontal en las concentraciones de 8-OHdG en saliva y plasma en pacientes con EP crónica, pusieron de manifiesto que, después del tratamiento periodontal, la concentración en la saliva se redujo significativamente con respecto al grupo control ($p=0,021$); por contra, las diferencias en las concentraciones plasmáticas de 8-OHdG entre los dos grupos no alcanzaron significación estadística¹⁹¹.

En el presente estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de 8-OHdG en orina después del tratamiento periodontal no quirúrgico cuando consideramos la población total, aunque sí se observó una fuerte tendencia a la significación en la correlación entre los niveles en orina y el índice BOP. Esto pone de manifiesto la posible relación entre la inflamación local y la reparación de los daños en el ADN provocados por el estrés oxidativo.

7.3 EFECTO ADYUVANTE DE LA DOXICICLINA TÓPICA A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO

Los trabajos sobre antimicrobianos de aplicación local de Roval y cols. (2016)²⁹⁰, Oringer y cols. (2002)²⁹¹, Bogle (1999)²⁹², Gupta y cols. (2008)²⁹³, entre otros,^{78,211-213,271} indican que prácticamente todos los microorganismos relacionados con la EP son sensibles a las tetraciclinas, de ahí la utilización de la doxiciclina, que es un derivado semisintético de segunda generación, como adyuvante del tratamiento periodontal. La literatura muestra resultados heterogéneos; de este modo, hay estudios que muestran el efecto de las tetraciclinas, sobre todo las de segunda generación, en la mejoría de los parámetros tanto clínicos como bioquímicos.

En la actualidad, una nueva estrategia farmacológica, denominada "terapia de modulación del huésped" por Yiğit y cols. (2017)²⁸⁷, está basada en tres hallazgos fundamentales: en primer lugar, a la facultad de los antibióticos semisintéticos derivados de las tetraciclinas (doxiciclina y minociclina) para frenar la degradación periodontal, que se debe, en gran parte, a su capacidad para inhibir las MPS de la matriz de colágeno del hospedador y, por lo tanto, a mecanismos no relacionados con las propiedades antimicrobianas; en segundo lugar, a que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, también mediante mecanismos no antimicrobianos, podrían reducir la gravedad de la enfermedad; y, en tercer lugar, a la capacidad de inhibir la reabsorción ósea de las tetraciclinas químicamente modificadas descritas en los trabajos de Ghangurde y cols. (2017)²⁹⁴. Yap y cols. (2019)²⁹⁵ señalan que la doxiciclina, como medicación adyuvante, se ha mostrado muy prometedora como complemento de la terapia mecánica tradicional en el tratamiento clínico de la EP, y parece reducir, al mismo tiempo, sus repercusiones sistémicas.

En esta línea, trabajos previos, como el realizado por Wilson y cols. (1997)²⁹⁶, utilizaron microesferas con liberación lenta de minociclina²⁹¹ o fibras con tetraciclina, que muestran importantes diferencias a corto plazo, como reportan los resultados obtenidos por los estudios de Tonetti y cols. (2012)²⁹⁷, Da Rocha y cols. (2015)²⁹⁸, entre otros^{219,220},

pero no así a largo plazo. Otros estudios como los de Drisko y cols. (1998)²⁹⁹, no muestran diferencias con respecto al tratamiento solo con RAR⁷⁹.

Dicha heterogeneidad de resultados podría explicarse como consecuencia del corto plazo de ejecución de los estudios, ya que casi todos están planteados a tres meses. Se ha sugerido en algunos estudios, como los de Martorelli y cols. (2004)³⁰⁰ y Deo y cols. (2011)³⁰¹, que sí obtienen resultados, incluso con significación estadística, que hace falta un seguimiento a más largo plazo, entre los 6 y los 12 meses, o bien la repetición de dosis a lo largo del tratamiento para optimizar la respuesta²⁹¹.

Tan y cols. (2011)³⁰², Hanes y cols. (2003)³⁰³, observaron que los agentes adyuvantes utilizados en el tratamiento periodontal no quirúrgico muestran diferentes eficacias, siendo la doxiciclina local en dosis única superior a otros compuestos y en comparación sobre el desbridamiento mecánico solo²²⁰. Algunos estudios, contrariamente a lo anteriormente señalado, en los que se utilizó la doxiciclina sistémica a dosis subantimicrobianas junto con RAR, no observaron una mejora significativa de los niveles de inserción clínica²⁹⁵.

En el presente estudio, las variables clínicas PIC e IP mejoraron con mayor significación en los casos tratados con doxiciclina, resultado que es congruente con los resultados obtenidos por los estudios de Wenstrom y cols. (2001)³⁰⁴, entre otros^{297,298}. Del mismo modo, con respecto a los pacientes tratados con doxiciclina tópica, se evidenció la existencia de un efecto de grupo, es decir, se partió de una situación inicial peor y las diferencias entre los valores basales y la situación a los tres meses fue similar en ambos grupos. De manera que no se observó la existencia de un beneficio adicional en lo que respecta a los parámetros clínicos, y por lo tanto, a nivel global no hubo efecto del fármaco, a excepción de la PS, que sí mostró cambios significativos en el grupo DOX, lo que valida la indicación de la doxiciclina tópica en las lesiones con PS \geq 5 mm.

En definitiva, nuestros resultados reportan que las variables clínicas periodontales dependientes del sondaje mejoraron de forma significativa, pero en magnitud comparable tanto en el grupo DOX como en el grupo control.

Con respecto a los cambios observados en los parámetros inflamatorios, estudios previos pusieron de manifiesto mejoras en los marcadores IL-6 y α TNF en pacientes a los que se aplica doxiciclina tópica²⁹⁸, mostrando los estudios de Marwa y cols. (2018)³⁰⁵ acciones moduladoras de la inflamación en su aplicación local, como ya habían observado Emingil y cols. (2019)³⁰⁶, Izuora y cols. (2016)³⁰⁷, Bretz (2012)³⁰⁸, tras su administración sistémica a dosis subterapéuticas. Algunos estudios demostraron que los niveles de PCR tanto en fluido crevicular gingival como en suero fueron más altos en los pacientes con EP y DM2, en comparación con los pacientes con solo EP, y, aunque hubo una mejora significativa tras el tratamiento en ambos grupos, se observó una disminución mayor de los niveles, tanto en el fluido crevicular gingival como en las muestras de suero, de los pacientes con EP y DM2²³⁹.

En el presente trabajo, en el grupo DOX se observó como hallazgo fundamental, una reducción significativa de los niveles séricos de fibrinógeno ($p=0,018$), mientras que, en el grupo control, los cambios estuvieron lejos de la significación, y se observó una tendencia próxima a la significación en el cambio producido en los niveles de PCRus. No hubo cambios significativos en ninguno de los marcadores en el grupo control, en consonancia con lo observado por estudios de Al Isa y cols. (2019)³⁰⁹, que no mostraron mejoría en los niveles de fibrinógeno después del tratamiento periodontal.

En el grupo DOX se observó una falta de correlación entre la PCRus y, como expresión del proceso inflamatorio local, con el índice BOP ($p=0,449$), permaneciendo en el grupo control los niveles igualmente inalterados ($p=0,389$). La falta de respuesta al tratamiento de variables como la PCRus, se interpretó como una consecuencia de la sobrecarga inflamatoria sistémica residual, ocasionada por la agresión como consecuencia del tratamiento periodontal, y que necesitaría más tiempo para su resolución, como demostraron los estudios previos de Saffi y cols. (2013)²⁷⁹ y de Lopez y cols. (2012)²⁸².

Con respecto al fibrinógeno, los resultados del presente trabajo se pueden interpretar, igualmente, como consecuencia de la agresión ocasionada por el tratamiento periodontal, que daría lugar a un incremento de los reactantes de fase aguda y que,

dadas las propiedades inmunomoduladoras de la doxiciclina, el balance final da como resultado una disminución de los valores séricos.

Tüter y cols. (2010)³¹⁰ y Sgolastra y cols. (2011)³¹¹, evaluaron en sus trabajos la eficacia de la dosis subantimicrobiana de doxiciclina (6 mg/kg) junto con el RAR en los niveles de fluido crevicular gingival y en los niveles séricos de PCRus en pacientes con EP crónica, y se observaron diferencias significativas para todos los parámetros clínicos investigados a favor del grupo en el que se aplicó doxiciclina. Yiğit y cols. (2017)²⁸⁷ sugirieron que compuestos fenólicos, como el ácido cafeico, tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos similares a la doxiciclina, resultando útil en el tratamiento de la enfermedad y por lo tanto demostrando que las propiedades antioxidantes de algunos compuestos van más allá de sus acciones antimicrobianas.

Igualmente, algunos estudios anteriores, como los de Chia y cols. (2020)²²⁰, Hanes y cols. (2003)³⁰³, mostraron cómo los agentes adyuvantes utilizados en el tratamiento periodontal no quirúrgico presentan diferentes eficacias, siendo la doxiciclina local en dosis única superior a otros compuestos, y en comparación con los resultados obtenidos por Tan y cols. (2020)³⁰², sobre el desbridamiento mecánico solo.

En definitiva, en el presente estudio se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de fibrinógeno, y una tendencia a la significación estadística en el cambio producido en los niveles de PCRus en suero en el grupo tratado con doxiciclina. Diversos medicamentos presentan beneficios clínicos que no están relacionados con sus indicaciones terapéuticas primarias. A estos beneficios se los llama efectos pleiotrópicos y, en muchos casos, se desconocen los mecanismos que los sustentan. Entre los medicamentos comúnmente recetados que exhiben estos beneficios en el tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación crónica, se encuentra la doxiciclina.

Estudios previos llevados a cabo por Deo y cols. (2011)³⁰¹, mostraron cómo la estructura primaria de estos medicamentos, al contener anillos fenólicos aromáticos semejantes a los polifenoles, posee actividad antioxidante e inhibe la fragmentación mitocondrial

inducida por el estrés oxidativo. De esta forma, la inflamación y el estrés oxidativo están íntimamente relacionados. La inflamación promueve el estrés oxidativo, que a su vez conduce a una mayor inflamación. Así, el estrés oxidativo y la inflamación establecen un ciclo que se perpetúa a sí mismo.

Clemens y cols. (2018)³¹², Yagan y cols. (2014)³¹³, pusieron de manifiesto en sus investigaciones cómo la doxiciclina inhibe la formación de subproductos, fruto de la oxidación de los ácidos grasos y la peroxidación lipídica. Es importante destacar que los aductos de MDA son altamente inmunogénicos e inician respuestas inflamatorias y, por lo tanto, alimentan el ciclo de inflamación y estrés oxidativo, induciendo como consecuencia la cronicidad. De esta forma, la reducción de la formación de aductos de MDA puede mejorar la inflamación que conduce a la producción de ROS y, de esta manera, romper el ciclo autosostenible de estrés oxidativo e inflamación. Por lo tanto, es posible que las propiedades antioxidantes poco reconocidas de estos medicamentos pueden ser un mecanismo que ofrezca un beneficio adicional en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas.

Más recientemente, Yagan y cols. (2018)³¹³ utilizaron dosis subantimicrobianas de doxiciclina en el tratamiento periodontal, dadas las características como inhibidor enzimático y las propiedades antiinflamatorias relacionadas, por las que la doxiciclina ayuda a prevenir la degradación del tejido periodontal al inhibir el estrés oxidativo local. Sulijaya y cols. (2019)³¹⁴, Altoé y cols. (2021)³¹⁵, demostraron que el estrés oxidativo es una de las principales causas de la destrucción del tejido. Por lo tanto, el concepto de EP ha cambiado, y nuestro enfoque del tratamiento debe ajustarse a este último paradigma. La modulación de la inflamación y el estrés oxidativo debe de ser considerado un objetivo primario, por lo tanto, la estrategia dirigida mediante los tratamientos antiinflamatorios y antioxidantes sirve como un excelente enfoque terapéutico para alcanzar el nivel deseado de beneficio clínico.

En el presente estudio, por una parte, no se observaron cambios significativos en los niveles de MDA y 8-OHdG después del tratamiento periodontal no quirúrgico en los grupos DOX y control. Por otra parte, se observaron correlaciones muy interesantes

entre los niveles de 8-OHdG en orina y el índice de sangrado postratamiento ($p=0,018$) en el grupo de pacientes tratados con doxiciclina. Dicho hallazgo significa que, a mayor índice de sangrado postratamiento, es decir, a mayor inflamación, se observan mayores niveles del marcador prooxidante 8-OHdG en orina, como consecuencia de los mecanismos de reparación de los daños en el ADN. Además, se observó una nueva correlación significativa entre los niveles séricos de PCRus y MDA en el grupo control ($p=0,033$) y una fuerte tendencia a la significación estadística en la correlación de MDA con los niveles de fibrinógeno ($p=0,056$). Es decir, aparecieron relacionados los procesos de LPO con los inflamatorios a nivel sistémico y la cronicidad de las patologías relacionadas con la inflamación sistémica de bajo grado.

7.4 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

En el presente estudio no se tienen en consideración otras exploraciones que de forma habitual se realizan para establecer un diagnóstico, como pueden ser las radiográficas, y otras menos habituales, como el análisis de los marcadores inflamatorios a nivel del fluido crevicular, que permiten profundizar en el diagnóstico etiológico y en la interpretación de los resultados, así como en el error aleatorio derivado del tamaño de la muestra. Por otra parte, el tiempo de duración del estudio ha sido clásicamente limitado a tres meses, pero hay estudios que consideran que este periodo se debe ampliar, con objeto de lograr resultados más concluyentes.

Como puntos fuertes, cabría señalar la meticulosa ejecución del estudio periodontal, intentando evitar los errores sistemáticos mediante la precisión en la recogida de datos, en su análisis y en la observación de los principales factores de confusión, como DM y tabaquismo, considerados en la clasificación de la AAP-EFP 2018.

La valoración de multitud de parámetros periodontales con mediciones en seis sitios por diente, y la combinación de parámetros indicadores de actividad inflamatoria, como el BOP, con otros de afectación periodontal, como PS y PIC, ofrecen tanto una visión de la enfermedad actual como de su evolución en el tiempo.

El punto de corte para la PS ≥ 3 mm, es el que mayoritariamente emplea la literatura para el establecimiento del diagnóstico según los criterios de la AAP-EFP 2018. La utilización de las variables número de dientes y porcentaje de sitios con PS, permite conocer la extensión de la EP y su repercusión sobre el resto de los valores del estudio. La determinación del índice BOP como indicador de inflamación local permite, al contrastarlo con las determinaciones de los parámetros bioquímicos, evidenciar su influencia sobre la inflamación sistémica.

El tratamiento en una sola sesión, o *full mouth*, con la utilización de antisépticos y antibióticos tópicos en el presente estudio, ha demostrado sobrados beneficios clínicos frente a los tratamientos que emplean solo el RAR realizado por cuadrantes distribuido en varias sesiones.

En resumen, son necesarios más estudios con características prospectivas y longitudinales, de mayor tamaño y duración, con la finalidad de objetivar con más precisión la influencia de la EP con la inflamación sistémica de bajo grado, y, como consecuencia, su relación con diversas patologías crónicas.

8. CONCLUSIONES

El estudio sobre la relación existente entre los parámetros clínicos de la EP y los niveles de los parámetros inflamatorios y prooxidantes permite colegir las siguientes conclusiones:

1. En respuesta al primer objetivo, la existencia de una correlación a nivel basal positiva entre la severidad de la EP por estadios y los niveles séricos de los marcadores inflamatorios, siendo los niveles de fibrinógeno los que mostraron un mayor grado de significación, fundamentalmente, en relación con el índice BOP. No se observó correlación con los marcadores prooxidantes objetos del estudio.
2. En respuesta al segundo objetivo, se observa una mejora significativa de la afectación periodontal tras el tratamiento periodontal, fundamentalmente, en estadios moderados y graves, junto con una reducción de los niveles séricos de los marcadores inflamatorios sobre todo en los casos graves y un ligero descenso no significativo de los niveles de 8-OHdG en orina.
3. En respuesta al tercer objetivo, en el grupo tratado con doxiciclina se evidencia una mejoría en la severidad de la EP, siendo la reducción de la PS superior a la observada en el grupo control. Los marcadores inflamatorios reducen sus niveles séricos, y, en el caso del fibrinógeno, de forma significativa. Los marcadores prooxidantes no experimentan cambios significativos.

Como conclusión, los hallazgos del presente estudio apoyan el concepto de que la EP, sobre todo en estadios avanzados, aumenta los niveles de los mediadores sistémicos de la inflamación que, por otra parte, son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Este hecho sugiere el papel que la inflamación sistémica de bajo grado puede tener en el desarrollo de las patologías crónicas e indica que los niveles de PCR y fibrinógeno pueden servir como biomarcadores importantes para evaluar el posible riesgo cardiovascular en estos pacientes. Se puede inferir que la EP, como enfermedad inflamatoria local, puede provocar igualmente un aumento del estrés oxidativo a nivel sistémico y estar involucrada en el desarrollo y perpetuación de las mencionadas enfermedades inflamatorias, abriendo de esta forma paso a nuevas estrategias terapéuticas. Los proyectos futuros deberán incluir estudios de mayor tamaño y duración, con la finalidad de objetivar con más precisión la influencia de la EP

con la inflamación sistémica de bajo grado, explorando al mismo tiempo las novedosas estrategias de modulación de la respuesta del huésped.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. García Núñez JA, Cuadrado Alonso J. Epidemiología e índices periodontales. En: Bascones Martínez, A. (coord.). Tratado de Odontología. Madrid: Schmidt Kline Beecham; 1998. 3337-52 p.
2. Armitage G C. Development of a classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-5.
3. Caton JG, Armitage GC, Berglund T y cols. A new classification scheme for periodontal and peri implant diseases and conditions: Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45:1-8.
4. Chapple ILC, Mealey BL, van Dyke TE y cols. Consensus report: Periodontal health and gingival diseases/conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45:68-77.
5. Ramseyer C, Mirra D, Schütz C, et al. Bleeding on probing as it relates to smoking status in patients enrolled in supportive periodontal therapy for at least 5 years. *J Clin Periodontol.* 2015;42:150– 9.
6. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):46-73.
7. Tonetti, MS, Greenwell, H, Kornman, KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;89(Sup 1):S159-S172.
8. Fine D, Patil AG, Loos B. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:95-111.
9. Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol.* 1976;3(1):38-53.
10. Lindhe J, Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol.* 1975;2(2):67-79.
11. Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol 2000.* 2020;83(1):90-106. doi: 10.1111/prd.12304. PMID: 32385879.

12. Almeida APCPSC, Fagundes NCF, Maia LC, Lima RR. Is there an Association Between Periodontitis and Atherosclerosis in Adults? A Systematic Review. *Curr Vasc Pharmacol*. 2018;16(6):569-82. doi: 10.2174/1570161115666170830141852. PMID: 28875830.
13. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134-44.
14. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29:10-21. doi:10.1034/j.1600-051x.29.s3.1. x.
15. Meyle J, Dommisch H, Groeger S, Giacaman RA, Costalonga M, Herzberg M. The innate host response in caries and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1215-25. doi: 10.1111/jcpe.12781. Epub 2017 Oct 24. PMID: 28727164.
16. Löe H, Anerud A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. Tooth mortality rates before 40 years of age. *Journal of periodontal research*. 1978;13(6):563-72.
17. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontology 2000*. 2005;39:91-99.
18. Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*. 1997;14:202-15.
19. Al-Ghamdi HS, Anil S. Serum antibody levels in smoker and non-smoker saudi subjects with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(6):1043-50.
20. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377-88.
21. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996;1:821-978.
22. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.

23. Mah TF, O'Toole G.A. Mechanisms of bio-film resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9:34-39.
24. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ. Gingival crevice fluid antibody to oral microorganisms. II. Distribution and specificity of local antibody responses. *J Periodontal Res.* 1985;20:349-56.
25. Carlsson J, Microbiology of plaque associated periodontal disease. *Textbook of clinical periodontology.* Copenhagen: Munksgaard; 1983. 125-53 p.
26. Hillman JD, Socransky SS, Bacterial interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycetencomitans* and its relationship to human periodontosis. *Arch oral Biol.* 1982;27:75-77.
27. Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):82-90. doi: 10.1007/s00774-020-01165-3. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33070252.
28. Medara N, Lenzo JC, Walsh KA, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Darby IB. Peripheral T helper cell profiles during management of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2021;48(1):76-90. doi: 10.1111/jcpe.13389. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33051896.
29. Vitkov L, Muñoz LE, Knopf J, Schauer C, Oberthaler H, Minnich B, Hannig M, Herrmann M. Connection between Periodontitis-Induced Low-Grade Endotoxemia and Systemic Diseases: Neutrophils as Protagonists and Targets. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4647 doi: 10.3390/ijms22094647.
30. Van der Velden U, Abbas F, Armand S, de Graaff J, Timmerman MF, van der Weijden GA, et al. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 1993;20(9):683-90.
31. Michalowics BS, Wolff LF, Klomp D, Hinrichs JE, Aeppli DM, et al. Periodontal bacteria in adult twins. *J Periodontol.* 1999;70(3):263-73.
32. Schenkein HA, Van Dyke TE. Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and patogénesis. *Periodontol 2000.* 1994;6:7-25.

33. Kornman KS, Crane A Wang H-Y et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24:72-7.
34. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2002;29:177- 206.
35. Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006;77(12):1978-83.
36. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998;3:327-38.
37. Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001;36:183-6.
38. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:28-34.
39. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diете A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:483-8.
40. Henning BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor IJ. Dinucleotide repeat polymorphism in the interleukin-10 gene promoter (IL-10 G) and genetic susceptibility to early-onset periodontal disease. *Genes Immun.* 2000;1:402-4.
41. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis if genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1999;34:379-86.
42. Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, Yoshie H. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:828-32.

43. Reinhold J, Bay I and Svejgaard. Association between HLA-Antigens and periodontal disease. *J Dent Res.* 1977;56:1261-3.
44. Goteiner D and Goldman M. Human Lymphocyte Antigen haplotype and resistance to periodontitis. *J Periodontol.* 1984 Mar;55(3):155-8. DOI:10.1902/jop.1984.55.3.155. PMID: 6584591.
45. Amer A, Singh G, Darke C and Dolby E. Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigen.* 1988;31:53-8.
46. Shapira L, Eizemgerg S, Sela MN, Soskolne A. and Brautbar H. HLA A9 and B15 are associated with generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J Periodontol.* 1994;65:219-23.
47. Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor IJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized earl-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:1032-8.
48. Kocher T, Sawaf H, Fanghanel J, Timm R, Meisel P. Association between bone loss in periodontal disease and polymorphism of NAT2. *J Clin Periodontol.* 2002;29:21-7.
49. Genco RJ, Loe H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993 Jun;2:98-116.
50. Oliver RC, Tervonen T. Periodontitis, and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *Journal of the American Dental Association.* 1993 Dec;124(12):71-6.
51. Heckmann SM, Linke JJ, Graef F, Foitzik C, Wichmann MG, Weber HP. Stress, and inflammation as a detrimental combination for peri-implant bone loss. *Journal of dental research.* 2006;85(8):711-6.
52. Gürgan CA, Altay U, Abaht K. Changes in inflammatory and metabolic parameters after periodontal treatment in obese and non-obese patients. *J Periodontol.* 2013;84(1):13-23.
53. Kaur G, Gupta N, Goyal L. Review article: obesity and periodontal disease. *Indian J Dent Sci.* 2010;2(5):33-35.

54. Escudero-Castaño N, Perea- García MA, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av Periodon Implantol.* 2008;20(1):27-37.
55. Kim YG, Lee SM, Bae S, Park T, Kim H, Jang Y, Moon K, Kim H, Lee K, Park J, Byun JS, Kim DY. Effect of Aging on Homeostasis in the Soft Tissue of the Periodontium: A Narrative Review. *J Pers Med.* 2021;11(1):58. doi: 10.3390/jpm11010058. PMID: 33477537; PMCID: PMC7831085.
56. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson D 3rd, Morford LA, Huja PE, Hartsfield JK Jr, Huja SS, Pandruvada S, Wallet SM. Aging, inflammation, immunity, and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2016;72(1):54-75. doi: 10.1111/prd.12135. PMID: 27501491.
57. Black AD. Roentgenographic studies of tissues involved in chronic mouth infections. *Dent. Summ.* 1918;38:924-35.
58. Baume LJ, Marenchaux SC. Standarization of the epidemiologic assessment of periodontal diseases. *Surveys in the south Pacific. J Periodontol.* 1975;46:233-9.
59. Anerud A, Löe A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. Changes in gingival healt and oral hygiene before 40 years of age. *J Periodontol.* 1979;14:526-40.
60. Bawden JW, Defriese GH. *Planning for Dental Care on Statewide Basis.* Chapel Hill: Dental Foundation of North Carolina; 1985. 87-89 p.
61. Page RC, Schroeder HE. *Periodontitis in man and other animals.* Basel: S. Karger; 1982.
62. Pabbla A, Duijster D, Grasveld A, Sekundo C, Agyemang C, van der Heijden G. Oral Health Status, Oral Health Behaviours and Oral Health Care Utilization Among Migrants Residing in Europe: A Systematic Review. *J Immigr Minor Health.* 2021;23(2):373-88. doi: 10.1007/s10903-020-01056-9.
63. Bravo M, Almerich JM, Canorea E, Casals E, Cortés FJ, Expósito AJ, Gómez G, Hidalgo G, Lamas M, Martínez Y, Monge M, Montiel JM, Navarro MI, Otero MP, Sainz C, Trullols MC. Encuesta de salud oral en España 2020. *RCOE.* 2021;26(2):4.

64. Gamonal J, Mendoza C., Espinoza I., Muñoz A., Urzúa I., Aranda W., et al. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol.* 2010;81:1403-10
65. Irfan VM, Dawson DV, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol.* 2001;3:14-21.
66. Pihlstrom BL, Periodontal risk assessment, diagnosis, and treatment planning. *Periodontol 2000.* 2001;25:37-58.
67. Ranfjord SP. Maintenance care and supportive periodontal therapy. *Quintessence Int.* 1993;24(7):465-71
68. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy; an evidence-based perspective of scaling a root planning. *J Clin Periodontol.* 2002;2(6):1672-724.
69. Holbrook TE, Low SB. Power-driver scaling polishing instruments in harden. *Clark's clinical dentistry.* Philadelphia: J.B. Lippincott; 1991. 1-24 p.
70. Schenk G, Fleming TF, Ruckdeshel G, Hickel R. Lack of antimicrobial effect on periodontopathic bacteria by ultrasonic and sonic scalers in vitro. *J Clin Periodontol.* 2000;27(2):116-9.
71. Christgau M, Manner T, Bever S, Hiller KA, Schmalz G. Periodontal healing after non-surgical therapy with a modified sonic scaler: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006;33:749-58.
72. Sculean A, Deppe H, Miron R, Schwarz F, Romanos G, Cosgarea R. Effectiveness of Photodynamic Therapy in the Treatment of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Monogr Oral Sci.* 2021;29:133-43. doi: 10.1159/000510189. Epub 2020 Dec 21.
73. Ameyaroy DK, Ramabhadran BK, Emmatty R, Paul TP, Jose P. Comparative evaluation of the effect of Ozone therapy and Photodynamic therapy in non-surgical management of Chronic periodontitis: A split mouth longitudinal study. *J Indian Soc Periodontol.* 2020;24(5):447-53.
74. Mason WE. Citric acid and its use in regenerative surgical periodontal therapy. *J Mich Dent Assoc.* 1986;68(2):74-6. PMID: 3517345.

75. Rosa CDDR, Gomes JML, Moraes SLD, Lemos CAA, da Fonte TP, Limirio JPJO, Pellizzer EP. Use of chlorhexidine chip after scaling and root planning on periodontal disease: A systematic review and meta-analysis. *Saudi Dent J.* 2021;33(1):1-10.doi: 10.1016/j.sdentj.2020.11.002. Epub 2020.
76. Fang H, Han M, Li QL, Cao CY, Xia R, Zhang ZH. Comparison of full-mouth disinfection and quadrant-wise scaling in the treatment of adult chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2016;51(4):417-30.
77. Noguchi S, Ukai T, Kuramoto A, Yoshinaga Y, Nakamura H, Takamori Y, Yamashita Y, Hara Y. The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium. *J Periodontal Res.* 2017;52(1):74-82. doi: 10.1111/jre.12370. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26957231.
78. Seymour RA, Hensman PA. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995;22:22-35.
79. Ratka-Krüger et al. Terapia periodontal no quirúrgica con doxiciclina tópica adyuvante: un estudio multicéntrico controlado aleatorizado enmascarado doble. Resultados microbiológicos. *J Periodontol.* 2005;76:66-74.
80. Mombelli A, Samaranayake L. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *International Dent J.* 2004;54(1):3-14
81. Golub LM, Lee HM. Periodontal therapeutics: Current host-modulation agents and future directions. *Periodontol* 2000. 2020;82(1):186-204. doi: 10.1111/prd.12315. PMID: 31850625; PMCID: PMC6973248.
82. Martel DP, Fox PR, Lamb KE, Carmichael DT. Comparison of closed root planning with versus without concurrent doxycycline hyclate or clindamycin hydrochloride gel application for the treatment of periodontal disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2019;254(3):373-9. doi: 10.2460/javma.254.3.373.
83. Bikowski et al. Sub antimicrobial dose doxycycline for acne and rosacea. *Skinned.* July-August 2003;2 (4):234-45.

84. Preshaw et al. Sub antimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol.* 2004;31(9):697-707.
85. Metzger and others: A low dose of doxycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2008;41(4):303-9.
86. Kim et al: Systemic detection of doxycycline after local administration. *Acta Odontol Escand,* 2009;67:289-96.
87. Eichholtz et al. Adjuvant topical doxycycline nonsurgical periodontal therapy: a double-blind randomized controlled multicenter study. *J Clin Periodontol.* 2002;29(2):108-17.
88. Carranza F. *Periodontología Clínica.* 9 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. 138-62 p.
89. Sanz Alonso M, Herrera González D. Asociación entre enfermedades periodontales y sistémicas, ¿existe la medicina periodontal? *RCOE.* 2001;6:259-68.
90. Beck JD, Offenbacher S, William R, Gibas P, García R. Periodontitis: ¿un factor de riesgo para la enfermedad del corazón coronaria? *Ann Periodontol.* 1998;3(1):127-41.
91. Hidalgo Florencia M. Las enfermedades gingivo-periodontales y sus repercusiones sistémicas. *Rev Fundac Juan José Carrero.* 2001;6(15):31-4.
92. Mealey B, Koekkevoold P. Medicina Periodontal. En: Carranza. *Periodontología Clínica.* 9 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. 243- 60 p.
93. Shi LX, Zhang L, Zhang DL, Zhou JP, Jiang XJ, Jin YL, Chang WW. Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2021;56(2):226-35. doi: 10.1111/jre.12872. Epub 2020 Dec 26.
94. Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16:329-34.

95. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;328:1676-85.
96. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Severe periodontitis, and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1996;67:1085-93.
97. Williams RC, Mahan CJ. Periodontal disease and diabetes in young adults. *JAMA.* 1960;172:776-8.
98. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes.* 1994;43:836-41.
99. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):20-9. Nepper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of RAGE: A cell surface receptor for AGEs. *J Biol Chem.* 1992;267:14998-15004.
100. Nepper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of RAGE: A cell surface receptor for AGEs. *J Biol Chem.* 1992;267:14998-15004
101. Nishimura F, Terranova VP, Foo H, Kurihara M, Kurihara H, Murayama Y. Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 1996;75:1664-71.
102. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Bissada NF. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res.* 1981;60:729-30.
103. Bissada NF, Manouchehr-Pour M, Haddow M, Spagnuolo PJ. Neutrophil functional activity in juvenile and adult-onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. *J Periodontol Res.* 1982;17:500-2.
104. Rayfeld EJ, Ault MJ, Keush GT, Brothers MJ, Nechemia's C, Smith H. Infection and diabetes: The case for glucose control. *Am J Med.* 1982;72:439-50.
105. Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, et al. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care.* 1990;13:836-40.

106. Miller LS, Manwell MA, Newbold D, Reding ME, Rasheed A, Blodgett J, Kornman KS. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol.* 1992;63:843-8. doi: 10.1902/jop.1992.63.10.843. PMID: 1403592.
107. Aldridge JP, Lester V, Watts TLP, Collins A, Viberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in Type-I diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1995;22:271-5.
108. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol.* 1996;67:1094-102.
109. Bobetsis YA, Barros SP, Offenbacher S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. *J Am Dent Assoc.* 2006;2(137):7-13.
110. Davenport ES, Williams CE, Sterne JA, et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res.* 2002;81(5):313-18.
111. Romero BC, Chiquito CS, Elejalde LE, Bernardoni CB. Relationship Between Periodontal Disease in Pregnant Women and the Nutritional Condition of Their Newborns. *J Periodontol.* 2002;10(73):1177-83.
112. Noack B, Klingenberg J, Weigelt J, Hoffmann T. Periodontal status and preterm low birth weight: a case control study. *J Periodontal Res.* 2005;40(4):339-45.
113. Pitiphat W, Joshipura KJ, Rich-Edwards JW, Williams PL, Douglass CW, Gillman MW. Periodontitis and Plasma C-Reactive Protein During Pregnancy. *J Periodontol.* 2006;5(77):821-5.
114. Horton AL, Boggess KA, Moss KL, Jared HL, Beck J, Offenbacher S J. Periodontal disease early in pregnancy is associated with maternal systemic inflammation among African American women. *J Periodontol.* 2008;79(7):1127-32.
115. Castaldi JL, Bertin MS, Gimenez F, Lede R. Periodontal disease: Is it a risk factor for premature labor, low birth weight or preeclampsia? *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(4):253-58.

116. Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Huttunen JK, Leinonen M, Ekman MR. Serological evidence of and association of a novel Chlamydia with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*. 1998;2:983-6.
117. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molyneaux N. Association of Helicobacter Pylori and Chlamydia pneumoniae infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ*. 1995;311:711-4.
118. Gostman I, Lotan CH, Soskolne WA, Rassoovsky S, Pugatsch T, Lapidus L. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol*. 2007;78:849-58.
119. Iwai T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodontol Res*. 2009;44:689-94.
120. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2006;33:401-7.
121. Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006;41:350-3.
122. Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol*. 2007;78:677-82.
123. Deshpande RG, Khan M, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*. 1998;66:5337-343.
124. Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulsk-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun*. 1999;67:5792-98.
125. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*. 2000;181:462-72.

126. Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease on cardiovascular disease risk: a systemic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2007;78:2289-302.
127. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL. Periodontal microbiota and carotid intima media thickness: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *Circulation.* 2005;111:576-82.
128. Beck JD, Eke P, Lin D. Associations between IgG antibody to oral organism and carotid intima media thickness in community dwelling adults. *Atherosclerosis.* 2005;183:342-8.
129. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36:541-9.
130. Gani DK, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P. Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2009;13:69-74.
131. Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H. Periodontitis associated up regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontol.* 2010;45:116-22.
132. Yoshii S, Tsuboi S, Morita I, Takami Y, Adachi K, Inukai J. Temporal association of elevated C- reactive protein and periodontal disease in men. *J Periodontol.* 2009;80:734-9.
133. D' Aiuto F, Nabali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS. Short term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res.* 2005;84:269-73.
134. Vidal F, Figueredo CM, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels, interleukin 6, C-reactive protein and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol.* 2009;80:786-91.
135. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celentin R, Kepschull M. Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009;36:287-94.

136. Blake GJ, Ridker PM. High sensitivity C reactive protein for predicting cardiovascular disease: an inflammatory hypothesis. *Eur Heart J*. 2001;22:349-52.
137. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342:836-43.
138. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*. 2007;356:911-20.
139. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesion of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-9.
140. Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326:242-50.
141. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74. doi: 10.1038/nature01323. PMID: 12490960.
142. Li H, Cybulski MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulated mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Atherosclerosis and Thrombosis*. 1993;13:197-204.
143. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1997;99:1037-43.
144. Skålen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002;417:750-4.
145. Leininger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:421-30.
146. Collins T, Cybulsky MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherosclerosis? *J Clin Invest*. 2001;107:255-64.

147. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschutz KT. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cell. *J Biol Chem.* 2001;276:13847-851.
148. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16:887-96.
149. Chou HH, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FC. *Porphyromonas gingivalis* fimbria dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73:5367-78.
150. Bengtsson, Karlsson H, Gunnarsson P, Skoglund C, Ellison C, Leanderson P, Lindahl M. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* cleaves apoB-100 and increases the expression of apoM in LDL in whole blood leading to cell proliferation. *J Inter Med.* 2008;263(5):558-71.
151. Kang JC, Kumaritsu HK. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells. *Immunol Med Microbiol.* 2002;34:311-7.
152. Aurer A, Aleksy J, Ivi-Cardium M, Aurer J, Culo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:565-8.
153. Zhang Y, Lundgren T, Renvert S, Tatakis DN, Firatli E, Uygur C. Evidence of a founder effect for four cathepsin C gene mutations in Papillon-Lefevre syndrome patients. *J Med Genet.* 2001;38:96-101.
154. Toumainen AM, Jauhiainen M, Kovenen PT, Metso J, Paju S, Pussinen PJ. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microbb Pathog.* 2008;44:111-7.
155. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR. Effects of inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004;45:1169-196.

156. Cueto A, Mesa F, Bravo M, Ocaña-Riola R. Periodontitis as risk factor acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adult. *J Periodontol.* 2005;40:36-42.
157. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-54.
158. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann NY Acad Sci.* 1982;389:406-18.
159. Gitlin JD, Colten HR. Molecular biology of the acute phase plasma proteins. In: Pick E, Landy M, eds. *Lymphokines.* Vol. 14. San Diego, Calif: Academic Press; 1987. 123-53 p.
160. Manfredi AA, Rovere-Querini P, Barbara Bottazzi B, Garlanda C, Alberto Mantovani A. Pentraxins, humoral innate immunity and tissue injury. *Curr Opin Immunology.* 2008;20:538-44.
161. D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease, and C-reactive protein associated cardiovascular disease. *J Periodontol Res.* 2004;39:236-41.
162. Castro, A. R., Silva, S. O., & Soares, S. C. The Use of High Sensitivity C Reactive Protein in Cardiovascular Disease Detection. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2018;21(1):496-503.
163. Buila NB, Ntambwe ML, Mupepe DM, Lubenga YN, Bantu JB, Mvunzi TS, Kabanda GK, Lepira FB, Kayembe PK, Ditu SM, MBuyamba-Kabangu JR. The Impact of hsCRP on Cardiovascular Risk Stratification in Pilots and Air Traffic Controllers. *Aerosp Med Hum Perform.* 2020;91(11):886-91.
164. Andersson C, Johnson AD, Benjamin EJ, Levy D, Vasan RS. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. *Nat Rev Cardiol.* 2019;(11):687-98. doi: 10.1038/s41569-019-0202-5. PMID: 31065045.
165. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases. An estate of the science review. *Ann Periodontol.* 2001;6(1):9-15.

166. Eaton C. Traditional and Emerging Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Prim Care Clin Office Pract.* 2005;32:963-76.
167. Herman WA, Krzoska A, Łacka K, Bugaj R, Dorszewska J. Ocena powiązań. Evaluation of the relationships between plasma homocysteine level and selected low-grade inflammation indices according to the prevalence of metabolic syndrome in men. *Pol Merkur Lekarski.* 2013;34(204):320-4. Polish. PMID: 23882927.
168. Cook NR, Buring JE, Ridker PM. The effect of including C-reactive protein in cardiovascular risk prediction models for women. *Ann Intern Med.* 2006;145:21-9.
169. Herzberg MC, Weyer MW. Dental plaque, platelet, and cardiovascular disease. *Ann Periodontol.* 1998;3 (1):151-60.
170. Noack B, Genco RJ, Trevisan M. Periodontal Infections Contribute to Elevated Systemic C-Reactive Protein Level. *J Periodontol.* 2001;72:1221-7.
171. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, Chiva-Blanch G. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol.* 2018;9:430. doi: 10.3389/fimmu.2018.00430. PMID: 29552019; PMCID: PMC5840191.
172. Ebersole JL, Capelli D, Mott G. Systemic acute phase reactants, C-Reactive Protein and Haptoglobin, in adult Periodontitis. *Clinical Exp. Immunol.* 1997;107:347-52.
173. Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000.* 2000;23:19-49.
174. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, Mackenzie D, Shearer B. Bacteremia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol.* 2005;32:708-13.
175. Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Beck JD, Caughey M, Brodala N, Madianos PN. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *Am Heart J.* 2006;151(1):47.
176. Mattila K, Vesanen M, Valtonen V. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis.* 2002;2:30-6.

177. Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res*. 2000;79:49-57.
178. Nehring SM, Goyal A, Bansal P, Patel BC. C Reactive Protein. 2021 May 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021 Jan-. PMID: 28722873.
179. Kaur J, Jain A. Fibrinogen. 2021 May 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 30725869.
180. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, Acute Phase Reactants. 2021 Apr 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 30137854.
181. Kweider M, Lowe G. Dental disease, fibrinogen y white cell count, links with myocardial infarction? *Scot Med*. 1993;38:73-4.
182. Becerik S, Öztürk VÖ, Celec P, Kamodyova N, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma oxidative stress markers and TGM-2 levels in chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2017;83:47-54. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.032. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28711023.
183. Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Nakamura Y. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. *Front Physiol*. 2017;30(8):351. doi: 10.3389/fphys.2017.00351. PMID: 28611683; PMCID: PMC5447763.
184. DelRio D, Stewart AJ, Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Card Dis*. 2005;15:316-28.
185. Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, Tenenbaum HC. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000*. 2020;84(1):45-68. doi: 10.1111/prd.12342. PMID: 32844417.
186. Valavanidis A, Vlachogianni T, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ*

- Carcinog Ecotoxicol Rev. 2009;2:120-39. doi: 10.1080/10590500902885684. PMID: 19412858.
187. Canakci CF, Cicek Y, et al. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent.* 2009;3(2):100-6.
188. Isola G, Polizzi A, Santonocito S, Alibrandi A, Ferlito S. Expression of Salivary and Serum Malondialdehyde and Lipid Profile of Patients with Periodontitis and Coronary Heart Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23):60-61.
189. Paredes-Sánchez E, Montiel-Company JM, Iranzo-Cortés JE, Almerich-Torres T, Bellot-Arcís C, Almerich-Silla JM. Meta-Analysis of the Use of 8-OHdG in Saliva as a Marker of Periodontal Disease. *Dis Markers.* 2018 May;2018:7916578. doi: 10.1155/2018/7916578. PMID: 29854026; PMCID: PMC5954896.
190. Dede FÖ, Ozden FO, Avci B. 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in gingival crevicular fluid and saliva in patients with chronic periodontitis after initial periodontal treatment. *J Periodontol.* 2013;84(6):821-8. doi: 10.1902/jop.2012.120195. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22897655.
191. Veljović T, Đurić M, Gušić I, Mirnić J, Čakić S, Maletin A, Brkić S. the influence of periodontal disease treatment on 8-hydroxy-deoxyguanosine concentrations in saliva and plasma of chronic periodontitis patients. *Acta Clin Croat.* 2020;59(4):615-22. doi: 10.20471/acc.2020.59.04.07. PMID: 34285432.
192. Avdeev A, Boykiv A, et al. Changes in the indicators of lipid peroxidation and antioxidant system in the serum of the blood in animals with experimental periodontitis with changed reactivity. *Georgian Med News.* 2019;287: 24-7.
193. Shih YM, Cooke MS, Pan CH, Chao MR, Hu CW. Clinical relevance of guanine-derived urinary biomarkers of oxidative stress, determined by LC-MS/MS. *Redox Biol.* 2019;20:556-65.
194. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ.* 1989;298:779-819.
195. Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen M, Huttunen JK. Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary

- artery disease. *Clin Infect Dis*. 1995;20:588-92.
196. Syrjanen J. Vascular diseases and oral infections. *J Clin Periodontol*. 1990;17:497-500.
197. Mattila K, Vesanen M, Valtonen V. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2002;2:30-6.
198. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart Lung Circ*. 2018;27(11):1327-34. doi: 10.1016/j.hlc.2018.05.102. Epub 2018 Jun 2. PMID: 29903685.
199. Pita S. Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria*. 1996;3:138-14.
200. Martínez MA, Sánchez-Villegas A, Toledo EA, Faulín J. *Bioestadística amigable*. 3a ed. Barcelona: Elsevier; 2014. 111-12 p.
201. Cortés Martincorena FJ. Medición de la salud y la enfermedad en odontología comunitaria. En: Cuenca Sala E, Baca García P. *Odontología Preventiva y Comunitaria: Principios, Métodos y Aplicaciones*. 3ª ed. Barcelona: Masson; 2005. 337-69 p.
202. Lindhe J. *Textbook of clinical periodontology*. Copenhagen: Munksgaard; 1983.
203. Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. *J Periodontol*. 1967;38:610-16.
204. Gettinger G, Patters MR, Testa MA, Anerud A, Boysen H, Robertson PB. The use of six teeth in population measures of periodontal status. *J Periodontol*. 1983;54(3):155-59.
205. Suvan J, Leira Y, Moreno Sancho FM, Graziani F, Derks J, Tomasi C. Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2020;47(22):155-75. doi: 10.1111/jcpe.13245. PMID: 31889320.
206. Pockpa AD, Soueidan A, Louis P, Coulibaly NT, Badran Z, Struillou X. Twenty Years of Full-Mouth Disinfection: The Past, the Present and the Future. *Open Dent J*. 2018;12:435-42. doi: 10.2174/1874210601812010435. PMID: 29988213; PMCID: PMC5997853.

207. Apatzidou DA. Modern approaches to non-surgical biofilm management. *Front Oral Biol.* 2012;15 99-116. doi: 10.1159/000329674. Epub 2011 Nov 11. PMID: 22142959.
208. Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent.* 2014;(2):251-67. PMID: 24765632.
209. Sagar A. Full mouth versus quadrant treatment in chronic periodontitis. *Prim Dent J.* 2014;3(3):66-9. doi: 10.1308/205016814812736853. PMID: 25198643.
210. Ratka-Krüger et al. Terapia periodontal no quirúrgica con doxiciclina tópica adyuvante: un estudio multicéntrico controlado aleatorizado enmascarado doble. Resultados microbiológicos. *J Periodontol.* 2005;76:66-74.
211. John MT, Michalowicz BS, Kotsakis GA, Chu H. Network meta-analysis of studies included in the Clinical Practice Guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2017;44 (6):603-11. doi: 10.1111/jcpe.12726. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28370333; PMCID: PMC5878541.
212. Ciancio S., Cobb C., Leung M. Tissue concentration and localization of tetracycline following site specific tetracycline fiber therapy. *J. Periodontol.* 1994;63:849-53.
213. Madison J., Hokett S. The effects of different tetracyclines in the dentin root surface of instrumented periodontally involved human teeth: A comparative scanning electron microscope study. *J. Periodontol.* 1997;68:739-41.
214. Brandy H, Newell D: Estrategias preventivas y tratamiento de sostén. *Periodontol 2000.* 2001;2:15-20.
215. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:66-77.
216. Matthews, J. B., Wright, H. J., Roberts, A., Cooper, P. R. & Chapple, I. L. C. Hyperactivity, and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clinical & Experimental Immunology.* 2007;147: 255-64.

217. Szwed P, Gąsecka A, Zawadka M, Eyileten C, Postuła M, Mazurek T, Szarpak Ł, Filipiak KJ. Infections as Novel Risk Factors of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases: Pathophysiological Links and Therapeutic Implications. *J Clin Med*. 2021;10(12):25-39. doi: 10.3390/jcm10122539.
218. Hamza SA, Asif S, Khurshid Z, Zafar MS, Bokhari SAH. Emerging Role of Epigenetics in Explaining Relationship of Periodontitis and Cardiovascular Diseases. *Diseases*. 2021;9(3):48. doi: 10.3390/diseases9030048. PMID: 34209817; PMCID: PMC8293072.
219. Preethi M, Rishi P, Gregory G, Steven E, Mingyuan S, John J, Venu M, Michael L, Stephen J. Association of Initial and Serial C-Reactive Protein Levels with Adverse Cardiovascular Events and Death After Acute Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol*. 2019;4(4):314-320.
220. Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:542-67. doi: 10.3389/fmed.2020.542567. PMID: 33117828; PMCID: PMC7575777.
221. Balamir I, Ates I, Topcuoglu C, Turhan T. Association of Endocan, Ischemia-Modified Albumin, and hsCRP Levels with Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Angiology*. 2018; 69(7): 609-16.
222. Maio R, Perticone M, Suraci E, Sciacqua A, Sesti G, Perticone F. Endothelial dysfunction, and C-reactive protein predict the incidence of heart failure in hypertensive patients. *ESC Heart Fail*. 2021 Feb;8(1):399-407. doi: 10.1002/ehf2.13088. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33236853; PMCID: PMC7835547.
223. Aljehani YA. Risk factors of periodontal diseases: Review of the literature. *Int J Dent*. 2014; (2014):182513. doi: 10.1155/2014/182513.
224. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59-94.
225. Aldridge JP, Lester V, Watts TLP, Collins A, Viberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in Type-I diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1995;22:271-5.

226. Benguigui C, Bongard V, Ruidavest JB, Chamontin B, Sixou M, Ferrières J, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: cross-sectional study in a middle-aged French population. *J Clin Periodontol*. 2010;37(7):601-8.
227. Song IS, Han K, Park YM, Ji S, Jun SH; Ryu JJ, et al. Severe periodontitis is associated with insulin resistance in non-abdominal obese adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4251-9.
228. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosebaum M, Friedewald WT, Jacobs DR, et al. Periodontitis infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2235-42.
229. Islam SK, Seo M, Lee YS, Moon SS, Association of periodontitis with insulin resistance, β -cell function, and impaired fasting glucose before onset of diabetes. *Endocr J*. 2015;62(11):981-9.
230. Porwal S, Tewari S, Sharma RK, Singhal SR, Narula SC. Periodontal status and high-sensitivity C-reactive protein levels in polycystic ovary syndrome with and without medical treatment. *J Periodontol*. 2014;85(10):1380-9.
231. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Higorani AD, Deanfield J et al. Association of the metabolic syndrome with periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3989-94.
232. Cecoro G, Annunziata M, et al. Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health. *A Scoping Review Medicine*. 2020;56(6):272. doi: 10.3390/medicine56060272. PMID: 32486269; PMCID: PMC7353850.
233. Radafshar G, Shad B, Ariamajd E, Geranmayeh S. Effect of intensive non-surgical treatment on the level of serum inflammatory markers in advanced periodontitis. *J Dent (Tehran)*. 2010;7(1):24-30.
234. Dikshit S. Fibrinogen Degradation Products and Periodontitis: Deciphering the Connection. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(12):10-2.

235. Albush MM, Razan KK, Raed AD. Effect of surgical and non-surgical periodontal debridement on vascular thrombotic markers in hypertensives. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(3):324-9.
236. Baima G, Corana M, Iaderosa G, Romano F, Citterio F, Meoni G, Tenori L, Aimetti M. Metabolomics of gingival crevicular fluid to identify biomarkers for periodontitis: A systematic review with meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2021;56(4):633-45. doi: 10.1111/jre.12872. Epub 2021 Mar 12. PMID: 33710624.
237. Cherian DA, Peter T, et al. Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019;(Suppl 2):297-300
238. Kesarwala AH, Krishna MC, et al. Oxidative stress in oral diseases. *Oral Dis.* 2016;22(1):9-18.
239. Muthuraj MSA, Janakiram S, Chithresan K, Maradi AP, Maddur PK, Rangaraju R. Effect of scaling and root planning on levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients with and without Type II diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol.* 2017;21(3):201-6. doi: 10.4103/jisp.jisp_184_17. PMID: 29440786; PMCID: PMC5803875.
240. Bansal N, Gupta ND, et al. Impact of nonsurgical periodontal therapy on total antioxidant capacity in chronic periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol.* 2017;21(4):291-5.
241. Guarnieri C, Zuchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhancer peroxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun.* 1991;5:11-6.
242. Altıngöz SM, Kurgan Ş, Önder C, Serdar MA, Ünlütürk U, Uyanık M, Başkal N, Tatakis DN, Günhan M. Salivary and serum oxidative stress biomarkers and advanced glycation end products in periodontitis patients with or without diabetes: A cross-sectional study. *J Periodontol.* 2021 Sep;92(9):1274-1285. doi: 10.1002/JPER.20-0406. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33277933.
243. Varghese J, Bhat V, et al. Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Odontology.* 2020;108(4):569-77. doi: 10.1007/s10266-020-00496-x. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32065311.

244. Anusuya S, Mlv P, Lazarus F, Bhavikatti SK, Babrawala IS. Estimation of 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in Saliva as a Marker of Oxidative Stress in Patients with Chronic Periodontitis: Preliminary Data. *J Int Acad Periodontol.* 2017;19(3):95-100. PMID: 31473696.
245. Kirkpatrick DT, Guth DJ, Malvis RD. Detection of in vivo lipid peroxidation using thiobarbituric acid assay for lipid hydroperoxides. *J Biochem Toxicol.* 1996;1(1):93-104.
246. Liu CS, Tsai CS, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res.* 2003;37:1307-17.
247. Kouda K, Nakamura H, et al. The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine. *Clin Biochem.* 2001;34:247-50.
248. Kadiiska MB, Gladen BC, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl (4) poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38:698-10.
249. Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative ADN base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:1389-94.
250. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Brit Med Bull.* 1993;49:523-44.
251. Cadet J, Delatour T, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* 1998;424:9-21.
252. Schmerold I, Niedermüller H. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp Gerontol.* 2001;36:1375-86.
253. Chen M, Cai W, Zhao S, Shi L, Chen Y, Li X, Sun X, Mao Y, He B, Hou Y, Zhou Y, Zhou Q, Ma J, Huang S. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2019;46(6):608-22. doi: 10.1111/jcpe.13112. PMID: 30989678.

254. Monje A, Alcoforado G, et al. Generalized aggressive periodontitis as a risk factor for dental implant failure: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2014;85(10):1398-407.
255. Varadan M, Gopalkrishna P, et al. Influence of polycystic ovary syndrome on the periodontal health of Indian women visiting a secondary health care center. *Clin Oral Investig.* 2019;23(8):3249-55.
256. Fraga CG, Shigenaga MK. et al. "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." *Proc. Natl Acad Sci.* 1990;87:4533-37.
257. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9):864. doi: 10.3390/antiox9090864. PMID: 32937950; PMCID: PMC7554855.
258. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA Damage, and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1808. doi: 10.3390/ijms18081808. PMID: 28825631; PMCID: PMC5578195.
259. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):801-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.009. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23791936.
260. Lily L, Chiuan-Chian Ch, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer atherosclerosis, and diabetics. *Clinical Chim Acta.* 2004 Jan;339(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.cccn.2003.09.010. PMID: 14687888.
261. Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U, Ozcan G. Effect of initial periodontal therapy on oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva, and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2015;86(2):273-82. doi: 10.1902/jop.2014.140338. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25325515.
262. Nguyen TT, Ngo LQ, et al. Salivary oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis and acute coronary. syndrome. *Clin Oral Investig.* 2017;21(7):2345-53.

263. Fentoğlu Ö, Kirzioğlu FY, et al. Evaluation of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in patients with periodontitis and hyperlipidemia. *J Periodontol.* 2015;86(5): 682-8
264. Saglam E, Canakci CF, et. al. Evaluation of oxidative status in patients with chronic periodontitis and polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *J Periodontol* 2018;89(1):76-84.
265. Akram Z, Safii SH, Vaithilingham RD, Baharuddin NA, Javez F, Vohra F. Efficacy of non-surgical periodontal therapy in the management of chronic periodontitis among obese and non-obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investg.* 2016;20(5):903-14.
266. Figuero E, Nóbrega DF, García-Gargallo M, Tenuta LM, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017;44(suppl 18):S116-S134.
267. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res.* 2005;84(3):269-73.
268. Duzagac E, Cifcibasi E, Erdem MG, Karabey V, Kasali K, Badur S, et al. Is obesity associated with healing after non-surgical periodontal therapy? A local vs. systemic evaluation. *J Periodontal Res.* 2016;51(5):604-12.
269. Bouazi W, Davideau JL, Tenenbaum H, Huck O, Adiposity Measurements, and non-surgical periodontal therapy outcomes. *J Periodontol.* 2015;86(9):1030-7.
270. Khan S, Khalid T, Bettiol S, Crocombe LA. Non-surgical periodontal therapy effectively improves patient-reported outcomes: A systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2021;19(1):18-28. doi: 10.1111/idh.12450. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32594621.
271. Genco R, Hammond B. Sensibilidad de los microorganismos periodontales a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos. En: Genco R, Goldman H, Cohen W, editores. *Periodoncia.* México: Interamericana Mc Graw-Hill; 1994. 173-5 p.

272. Lecio G, Ribeiro FV, Pimentel SP, Reis AA, da Silva RVC, Nociti-Jr F, Moura L, Duek E, Casati M, Casarin RCV. Novel 20% doxycycline-loaded PLGA nanospheres as adjunctive therapy in chronic periodontitis in type-2 diabetics: randomized clinical immune, and microbiological trial. *Clin Oral Investig*. 2020;24(3):1269-79. doi: 10.1007/s00784-019-03005-9. Epub 2019 Jul 20. PMID: 31327083.
273. Trajano VCDC, Brasileiro CB, Henriques JAS, Cota LM, Lanza CR, Cortés ME. Doxycycline encapsulated in β -cyclodextrin for periodontitis: a clinical trial. *Braz Oral Res*. 2020;33:112. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0112. PMID: 31939496.
274. AL-Isa M, Alotibi M, Alhashemi H, Althobiani F, Atia A, Baz S.. Effect of non-surgical periodontal therapy on the fibrinogen levels in chronic periodontitis patients. *Saudi Dent J*. 2019;31(2):188-93.
275. Ide M, McPartlin D, Coward PY, Crook M, Lumb P, Wilson RF.. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol*. 2003;30(4):334-40.
276. López Néstor J, Quintero Antonio, Llancaqueo Marcelo, Jara Lilian. Effects of periodontal therapy on markers of systemic inflammation in patients with coronary heart disease risk. *Rev. Med. Chile [Internet]*. 2009;137(10):1315-22.
277. Chandy S, Joseph K, Sankaranarayanan A, Issac A, Babu G, Wilson B, Joseph J. Evaluation of C-Reactive Protein and Fibrinogen in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis: A Clinico-Biochemical Study. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(3):ZC41-ZC45. doi: 10.7860/JCDR/2017/23100.9552. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28511507; PMCID: PMC5427433.
278. Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VE, Abbas F, D'Aiuto F, Kastelein JJ, Loos BG. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jan;41(1):70-9. doi: 10.1111/jcpe.12171. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24111886.
279. Saffi MA, Furtado MV, Montenegro MM, Ribeiro IW, Kampits C, Rabelo-Silva ER, Polanczyk CA, Rösing CK, Haas AN. The effect of periodontal therapy on C-reactive protein, endothelial function, lipids and proinflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2013;14:283. doi: 10.1186/1745-6215-14-283.

280. Vidal F, Cordovil I, Figueredo CMS, Fischer RG. Non-surgical periodontal treatment reduces cardiovascular risk in refractory hypertensive patients: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2013;40:681-87. doi: 10.1111/jcpe.12110.
281. López Néstor J, Chamorro Adriana, Llancaqueo Marcelo. Association between atherosclerosis and periodontitis. *Rev. Med. Chile [Internet].* 2011;139(6):717-24.
282. López NJ, Quintero A, Casanova PA, Ibieta CI, Baelum V, López R. Effects of Periodontal Therapy on Systemic Markers of Inflammation in Patients with Metabolic Syndrome: A Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2012;83:267-78. doi: 10.1902/jop.2011.110227.
283. Llambes F, Silvestre FJ, Hernández-Mijares A, Guiha R, Bautista D, Caffesse R. Effect of periodontal disease and non-surgical periodontal treatment on C-reactive protein. Evaluation of type 1 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17(4):562-8. doi: 10.4317/medoral. 17993.
284. Offenbacher S, Beck, JD, Moss K, Mendoza L, Paquette DW, Barrow DA; et al. 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 vascular disease. *J Periodontol.* 2009;80(2):190-201.
285. Chimenos-Küstner E, Giovannoni ML, Schemel-Suárez M. Dysbiosis as a determinant factor of systemic and oral pathology: importance of microbiome. *Med Clin (Barc).* 2017;149(7):305-9. doi: 10.1016/j.medcli.2017.05.036. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28669517.
286. Sulijaya B, Takahashi N, Yamazaki K. Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Arch Oral Biol.* 2019;105:72-80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.07.002. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31288144.
287. Yiğit U, Kirzioğlu FY, Uğuz AC, Nazıroğlu M, Özmen Ö. Is caffeic acid phenethyl ester more protective than doxycycline in experimental periodontitis? *Arch Oral Biol.* 2017;81:61-68. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.017. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28482239.

288. Önder C, Kurgan Ş, Altingöz SM, Bağış N, Uyanık M, Serdar MA, Kantarcı A, Günhan M. Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1961-69. doi: 10.1007/s00784-016-1984-z. Epub 2016 Nov 2. PMID: 27807715.
289. Öngöz Dede F, Bozkurt Doğan Ş, Ballı U, Avcı B, Durmuşlar MC. The effect of initial periodontal treatment on plasma, gingival crevicular fluid and salivary levels of 8-hydroxy-deoxyguanosine in obesity. *Arch Oral Biol*. 2016;62:80-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.014. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26655951.
290. Roval ES, Souto ML, Ganhito JA, Holzhausen M, Chambrone L, Pannuti CM. . Efficacy of Local Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Patients with Periodontitis and Diabetes: A Systematic Review. *J Periodontol*. 2016;87(12):1406-17.
291. Oringer RJ, Al-Shammari KF, Giannobile WV. Effect of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption. *J Periodontol*. 2002;73(8):835-42.
292. Bogle G. Locally delivered doxycycline hyclate: case selection, preparation, and application. *Compend Contin Educ Dent*. 1999;20(4 Suppl):26-33.
293. Gupta R, Pandit N, Aggarwal S, Verma A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(7):25-32.
294. Ghangurde AA, Ganji KK, Bhongade ML, Sehdev B. Role of Chemically Modified Tetracyclines in the Management of Periodontal Diseases: A Review. *Drug Res (Stuttg)*. 2017;67(5):258-65. doi: 10.1055/s-0043-100633. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28268238.
295. Yap KCH, Pulikkotil SJ. Systemic doxycycline as an adjunct to scaling and root planning in diabetic patients with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):209. doi: 10.1186/s12903-019-0873-7. PMID: 31488125; PMCID: PMC6728970.
296. Wilson TG Jr, McGuire MK, Greenstein G, . Tetracycline fibers plus scaling and root planning versus scaling and root planning alone: similar results after 5 years. *J Periodontol*. 1997; 68(11):1029-32.

297. Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Eickholz P, Fourmoussis I, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B. Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2012;39:475–82. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01864.
298. Da Rocha HA, Silva C. Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol.* 2015;17(3):82-90.
299. Drisko CH. The use of locally delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 1998;11(2):947-52.
300. Martorelli de Lima AF, Cury CC, Palioto DB, Duro, AM, Silva, RC, Wolff LF. Therapy with adjunctive doxycycline local delivery in patients with type 1 diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004;31:648-53. doi: 10.1111/j.0303-6979.2004.00576.x
301. Deo V, Ansari S, Mandia S, Bhongade M. Therapeutic Efficacy of Subgingivally Delivered Doxycycline Hyclate as an Adjunct to Non-surgical Treatment of Chronic Periodontitis. *J Oral Maxillofac Res.* 2011;2(1):3. doi: 10.5037/jomr.2011.2103.
302. Tan OL, Safii SH, Razali M. Clinical Efficacy of Single Application Local Drug Delivery and Adjunctive Agents in Nonsurgical Periodontal Therapy: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Pharmaceutics.* 2020;12(11):1086.doi: 10.3390/pharmaceutics12111086. PMID: 33198248; PMCID: PMC7698182.
303. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):79-98. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.79. PMID: 14971250.
304. Wennström JL, Newman HN, Macneill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam DG, Krok L, Needleman IG, Weiss G, Garrett S. Utilisation of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis: A comparative multi-centre trial of 2 treatment approaches. *J Clin Periodontol.* 2001;28:753-61. [DOI: 10.1034/j.1600-051x.2001.280806.x] [Cited by in Crossref: 73]

305. Marwa M, Verica P, Wael S, Adel A. The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis, *Acta Odontol Scand*. 2018;76 (1):71-6.
306. Emingil G, Gürkan A, Tervahartiala T, Hernandez M, Özgül S, Sorsa T, Alassiri S. Adjunctive Effects of a Sub-Antimicrobial Dose of Doxycycline on Clinical Parameters and Potential Biomarkers of Periodontal Tissue Catabolism. *Dent J (Basel)*. 2019;7(1):9. doi: 10.3390/dj7010009. PMID: 30669541; PMCID: PMC6473443.
307. Izuora KE, Ezeanolue EE, Neubauer MF, Gewelber CL, Allenback GL, Shan G, Umpierrez GE. Changes in Inflammatory and Bone Turnover Markers After Periodontal Disease Treatment in Patients with Diabetes. *Am J Med Sci*. 2016;351(6):589-94.
308. Bretz WA. Low-dose doxycycline plus additional therapies may lower systemic inflammation in postmenopausal women with periodontitis. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(3 Suppl):67-8.
309. Al Isa M, Alotibi M, Alhashemi H, Althobiani F, Atia A, Baz S. Effect of non-surgical periodontal therapy on the fibrinogen levels in chronic periodontitis patients. *Saudi Dent J*. 2019;31(2):188-93.
310. Tüter G, Serdar M, Kurtiş B, Walker SG, Atak A, Toyman U, Pinar S, Aykan T. Effects of scaling and root planning and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase 8, -13 and serum levels of hsCRP in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(8):1132-9. doi: 10.1902/jop.2010.090694. PMID: 20370419.
311. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Giannoni M, Monaco A. Long-term efficacy of subantimicrobial-dose doxycycline as an adjunctive treatment to scaling and root planning: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2011;82(11):1570-81. doi: 10.1902/jop.2011.110026. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21417590.
312. Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, Chiou A, McGowan JD, Hunter CD, Schlichte SL, Tian J, Klassen LW, O'Dell JR, Thiele GM, Mikuls TR, Zimmerman MC, Anderson DR. Novel Antioxidant Properties of Doxycycline. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):40-78. doi: 10.3390/ijms19124078. PMID: 30562944; PMCID: PMC6321135.

313. Yağan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2014;85(3):478-89. doi: 10.1902/jop.2013.130138. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23786405.
314. Sulijaya B, Takahashi N, Yamazaki K. Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Arch Oral Biol.* 2019;105:72-80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.07.002. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31288144.
315. Altoé LS, Alves RS, Miranda LL, Sarandy MM, Bastos DSS, Gonçalves-Santos E, Novaes RD, Gonçalves RV. Doxycycline Hyclate Modulates Antioxidant Defenses, Matrix Metalloproteinases, and COX-2 Activity Accelerating Skin Wound Healing by Secondary Intention in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Apr;2021. ID 4681041. doi: 10.1155/2021/4681041. PMID: 33959214; PMCID: PMC8075706.

10. ANEXOS

ANEXO I: ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

- I. 1 Certificado Comité Ético de Investigación Clínica*
- I. 2 Certificado de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios*
- I. 3 Hoja de información al paciente*
- I. 4. Consentimiento informado y Ley Orgánica de Protección de Datos*

ANEXO II: MATERIAL PARA LA RECOGIDA DE DATOS

- II. 1. Ficha del paciente y periodontograma*

ANEXO III: PUBLICACIONES

- III. 1 Publicaciones en acceso abierto*
- III. 2 Publicación Journal Citation Reports*

ANEXO I: ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

I. 1 Certificado Comité Ético de Investigación Clínica

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS
D. Fernando Sánchez-Toril López Presidente del **Comité de Ética de la Investigación con medicamentos** del Hospital Arnau de Vilanova-Llíria

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la siguiente propuesta de ensayo clínico
CÓDIGO: **RAM-LIG-2019-01** NÚMERO EUDRACT: **2019-002239-27**
TÍTULO: “**Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles séricos de proteína c reactiva ultrasensible y fibrinógeno**”

PROMOTOR: **Clinica Dental AndreuDental**
PROTOCOLO: **V1.0 de 15 de julio de 2019**
HIP/CI GENERAL: **V1.0 de 15 de julio de 2019**

Procedimientos y material utilizado para el reclutamiento de los sujetos (anuncios publicitarios, información en la web, folletos informativos, etc).
Versión: NA

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte I de la solicitud de autorización del ensayo, ha valorado las respuestas del promotor a las aclaraciones solicitadas (si las hubiera) y ha transmitido a la Agencia Española de medicamentos su opinión final sobre la parte I.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte II de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el art 7 del reglamento (UE) 536/2014 y considera que:

- El procedimiento para obtener el consentimiento informado (incluyendo las hojas de información al sujeto de ensayo y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previstos en el capítulo II del Real Decreto 1090/2015.
- Las compensaciones previstas a los participantes son adecuadas, así como las previsiones de indemnización por daños y perjuicios que pueda sufrir el participante.
- El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- El uso futuro de las muestras biológicas obtenidas durante el ensayo se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.
- Para la realización del ensayo se consideran adecuados los centros e investigadores previstos en el anexo II a este dictamen, teniendo en cuenta las declaraciones de idoneidad emitidas por el promotor y por los responsables de las instituciones correspondientes.

Que este Comité decidió emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día **18/09/2019 (acta nº 10/2019)**.

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real Decreto 1090/2015 – para que la decisión del citado CEIm sea válida.



Que el CEIm del hospital Arnau de Vilanova-Llíria, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del hospital Arnau de Vilanova-Llíria es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Lo que firmo en Valencia a, 18 de septiembre de 2019

Fdo. Dr. Fernando Sánchez-Toril López

Anexo I
COMPOSICION DEL CEIm

Presidente	Sánchez –Toril López, Fernando — Facultativo especialista en Neumología
Vicepresidente	Parra Gasent, Alberto — Farmacéutico de Atención Primaria
Secretario	Andreu Ballester, Juan Carlos — Facultativo Urgencias
Vocales	Casanoves Laparra, Eloina — Facultativo Unidad de Cuidados Intensivos
	Dalli Peydró, Ernesto — Facultativo especialista en Cardiología
	Esplugues Mota, Juan Vicente — Facultativo especialista en Farmacología Clínica
	García Sánchez, Jose — Facultativo especialista en Oncología
	Mª Carmen González Jiménez — Diplomada Enfermería
	López Chuliá, Francisca — Facultativa especialista en Hematología.
	Llombart Cussac, Antonio — Facultativo especialista en Oncología
	Moral Baltuille, Mª Desamparados — Facultativa especialista Laboratorio. Analisis Clínicos
	Ordoño Dominguez, Fermin — Facultativo especialista en Neurofisiología
	Rodríguez Baixauli, Francisco — Miembro Lego. Unión de Consumidores
	Santos Romero, María Angeles — Técnico en Función Administrativa
	Soler Company, Enrique — Farmacéutico Hospital
	Ubeda Sansano, Mª Isabel — Pediatra en Atención Primaria. C.S.Eliana
	Martínez Fernández, Mª Isabel — Administrativa

ANEXO I: ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

1. 2 Certificado de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO
Área de Ensayos Clínicos

Referencia: MUH/CLIN/EC

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE UN ENSAYO CLÍNICO

DESTINATARIO: Unidad de Apoyo a la Investigación
CHUAC - Hotel de Pacientes, despacho 703. C/ Xubias de arriba, 84.
15006 A Coruña (España)

DATOS DE LA SOLICITUD

Solicitud de autorización del Ensayo clínico N° EudraCT **2019-002239-27** y título **ESTUDIO SOBRE LA RELACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LOS NIVELES SÉRICOS DE PROTEÍNA C REACTIVA ULTRASENSIBLE Y FIBRINÓGENO.**

Promotor: Clinica Dental AndreuDental
Calle Maestro Soler, 19-1
46980 Paterna-Valencia (España)

Fecha de solicitud válida: 09/07/2019

Una vez evaluada la solicitud de autorización de ensayo clínico previamente indicada, se considera que cumple con los requisitos indicados en el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos y demás legislación aplicable*.

Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias **RESUELVE:**

AUTORIZAR el ensayo clínico solicitado y CALIFICARLO como de bajo nivel de intervención.

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en los artículos 123 y 124 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de

* Texto refundido de la Ley de Garantías y Uso Racional de los medicamentos y productos sanitarios, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio.
Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y se aprueba su Estatuto".

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Fecha de la firma: 24/09/2019

Puede comprobar la autenticidad del documento en la sede de la AEMPS: <https://sede.aemps.gob.es>

Localizador: A E X Y 8 L Y F 1 E



CORREO ELECTRÓNICO

smhaem@aemps.es

Página 1 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

 **m** agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios

Fdo. M^a Jesús Lamas Díaz

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Fecha de la firma: 24/09/2019

Puede comprobar la autenticidad del documento en la sede de la AEMPS: <https://sede.aemps.gob.es>

Localizador: A E X Y 8 L Y F 1 E



CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 2 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043

ANEXO I: ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

1. 3 Hoja de información al paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes.

INVESTIGADOR: RICARDO ANDREU MARTÍNEZ.

CENTRO: Clínica dental AndreuDental.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA - LLÍRIA.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, leer antes este documento y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea puede llevar el documento, consultarlo con otras personas y tomarse el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con los profesionales sanitarios que le atienden ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

Determinar si la enfermedad periodontal altera ciertos marcadores, como la proteína C Reactiva, que están implicados en la salud cardiovascular.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque está diagnosticado de enfermedad periodontal.

¿En qué consiste mi participación? Puesto que va a ser tratado de su problema periodontal, se le tomarán muestras de sangre (y en ocasiones de orina) antes de iniciar el tratamiento y transcurridos tres meses de este, con objeto de contrastar los resultados.

Su participación tendrá una duración total estimada de aproximadamente de 20 minutos para el examen inicial más una hora para el tratamiento periodontal y 20 minutos para la reevaluación al cabo de tres meses.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Las únicas molestias son las originadas como consecuencia de las extracciones de muestras de sangre al inicio del estudio y a los tres meses de finalizado el mismo.

“Su participación no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual”.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre las posibles repercusiones cardiovasculares de la enfermedad periodontal. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

Información referente a datos/muestras:

La obtención, tratamiento, conservación, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016) y Ley 03/2018 de 5 de diciembre de protección de datos de carácter personal y garantía de derechos digitales.

La institución en la que se desarrolla esta investigación es la responsable del tratamiento de sus datos pudiendo contactar con el delegado/a de Protección de Datos.

Los datos/muestras necesarias para llevar a cabo este estudio serán recogidos y conservados

- Anonimizados (Codificados).

La anonimización tiene por objeto eliminar o reducir los riesgos de reidentificación de los datos, manteniendo así la veracidad de los resultados del procesamiento de los mismos.

Derechos sobre sus datos y contacto con el delegado de Protección de Datos.

La normativa que regula el tratamiento de datos de personas le otorga el derecho a acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión de los mismos. También puede solicitar una copia de éstos o que ésta sea remitida a un tercero (derecho de portabilidad).

Para ejercer estos derechos puede Ud. dirigirse al delegado/a de Protección de Datos del centro a través de los medios de contacto antes indicados o al investigador/a principal de este estudio.

Así mismo, Ud. tiene derecho a interponer una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos, cuando considere que alguno de sus derechos no haya sido respetado.

Únicamente el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos en el estudio.

Se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información se transmita a otros países, se realizará con un nivel de protección de datos equivalente, como mínimo, al establecido por la normativa española y europea.

Al terminar este estudio, y conforme a la normativa, sus muestras biológicas y sus datos serán

- Destruídos.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por D. Ricardo Andreu Martínez con fondos propios.

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con D. Ricardo Andreu Martínez en el teléfono y/o correo electrónico.

Muchas gracias por su colaboración

RICARDO ANDREU MARTINEZ. Versión: 0001, 02/05/2019- Página 4/4

ANEXO I: ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

I. 4. Consentimiento informado y Ley Orgánica de Protección de Datos

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes.

Yo,

-
- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: D. Ricardo Andreu Martínez y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.
 - Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
 - Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
 - Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.

Una vez terminado el estudio, LOS DATOS/MUESTRAS recogidas acepto que sean DESTRUIDOS

Fdo.: El/la participante,

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: Ricardo Andreu Martínez

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN

ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN (para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes.

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó a _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprende que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.

Una vez terminado el estudio, LOS DATOS/MUESTRAS recogidas acepto que sean DESTRUIDOS

Fdo.: El/la testigo

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: Ricardo Andreu Martínez

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN
EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TÍTULO: Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes.

Yo, _____, representante legal de
_____:

Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.

Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.

Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio

Una vez terminado el estudio, LOS DATOS/MUESTRAS recogidas acepto que sean DESTRUIDOS

Fdo.: El/la representante legal,

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Ricardo Andreu Martínez

Consentimiento explícito ESTUDIO SOBRE SALUD PERIODONTAL

PATERNA, en fecha

RICARDO ANDREU MARTÍNEZ es el responsable del tratamiento de los datos personales del Interesado y le informa que estos datos serán tratados de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 de 27 de abril (GDPR) y la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre (LOPDGDD), por lo que se le facilita la siguiente información del tratamiento.

Fines del tratamiento:

- Participación del interesado en el Estudio sobre la relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de marcadores inflamatorios y prooxidantes.
- Fines estadísticos y / o científicos.

Criterios de conservación de los datos: se conservarán durante no más tiempo del necesario para mantener el fin del tratamiento y cuando ya no sea necesario para tal fin, se suprimirán con medidas de seguridad adecuadas para garantizar la anonimización de los datos o la destrucción total de los mismos.

Comunicación de los datos: no se comunicarán los datos a terceros, salvo obligación legal.

Derechos que asisten al Interesado:

- Derecho a retirar el consentimiento en cualquier momento.
- Derecho de acceso, rectificación, portabilidad y supresión de sus datos y a la limitación u oposición a su tratamiento. - Derecho a presentar una reclamación ante la Autoridad de control (www.aepd.es) si considera que el tratamiento no se ajusta a la normativa vigente.

Para realizar el tratamiento de datos descrito, el responsable del tratamiento necesita su consentimiento explícito o el de su representante legal.

El Interesado consiente el tratamiento de sus datos en los términos expuestos:

Nombre, con NIF
.....

Representante legal de, con NIF
.....

Firma:

Versión: 0001, 02/05/2019- Página 7/7

RICARDO ANDREU MARTINEZ. PATERNA (Valencia)

ANEXO II: MATERIAL PARA LA RECOGIDA DE DATOS

II. 1. Ficha del paciente y periodontograma

FICHA DEL PACIENTE

Nº Historia:

Fecha:

Edad:

Fecha nacimiento:

Sexo:

Teléfono:

PERFIL MÉDICO/FACTORES MODIFICADORES

Diabetes mellitus:

Fumador < 10:

≥ 10:

Medicación:

Otros:

Historia dental:

Tratamiento periodontal anterior (Fecha):

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Edentulismo total.
- Tratamiento periodontal durante el último año.
- Embarazadas o en periodo de lactancia.
- Diagnosticados de GUN o PUN.
- Diagnosticados de VIH.
- Ángor, infarto de miocardio, o AVC recientes.
- Procesos inflamatorios agudos o traumatismos recientes.
- Ingesta crónica de AINES o glucocorticoides.
- Toma de antibióticos en los últimos tres meses.

PARÁMETROS PERIODONTALES. Periodontograma

PS 3m																									
PS 0																									
MAXILAR palat. vest.																									
PS 0																									
PS 3m																									
+																									
PS 3m																									
PS 0																									
MANDIBULA vest. palat.																									
PS 0																									
PS 3m																									

	Basal	3 meses
PS (mm)		
PIC (mm)		
n dientes total		
n PS ≥ 4 mm		
n PS ≥ 6 mm		
% PS ≥ 4 mm		
% PS 1-3 mm		
% PS 4-5 mm		
% PS ≥ 6 mm		

Índice de sangrado

7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7	
	— %
7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7	
	— %

Índice de Placa

	1.6	2.1	2.4	3.6	4.1	4.4
0						
3m						

III. PUBLICACIONES

III. 1. Publicaciones en acceso abierto

1. Andreu R, Santos-Del-Riego S. Effects of topical doxycycline on inflammatory markers in periodontal disease. Clin Sci Res Rep. 2020;3: DOI: 10.15761/CSRR.1000130
2. Andreu R, Santos-del-Riego S, Payri F. Inflammatory and prooxidant markers in response to periodontal treatment. A case report. Int Clin Med. 2020;4: DOI: 10.15761/ICM.1000182.

Effects of topical doxycycline on inflammatory markers in periodontal disease

Ricardo Andreu^{1,2*} and Sergio S del Riego²

¹Dental Clinic, Paterna, Valencia, Spain

²Department of Physiotherapy Medicine and Biomedical Sciences, University of A Coruña, A Coruña, Spain

Abstract

Periodontal disease is an infectious and inflammatory process of the supporting structures of the teeth, the result of the interaction between infection by pathogenic bacteria and the host's immune response. In periodontitis patients, compared to those with good periodontal health, there appears to be an increased risk of some systemic diseases in general and coronary artery disease in particular. It is not evident that this association is causal and, therefore, could be considered an independent factor for the development of cardiovascular diseases.

Introduction

Effects of topical doxycycline

Almost all microorganisms related to periodontal disease are sensitive to tetracyclines, because of this we use doxycycline, which is a second-generation semi-synthetic derivative, as an adjunct to periodontal treatment [1-4].

The literature shows heterogeneous results, thus, there are studies that show the effect of tetracyclines, especially second-generation ones, on the improvement of both clinical and biochemical parameters [5-8]. According to this line of thinking, there are studies that use slow release microspheres of minocycline or fibers with tetracycline [9-10]. Therefore, there are important differences in the short-term, but not in the long-term, and others that do not show differences regarding to scraping and root planning [11-14]. The heterogeneity of the results could be explained because of the short-term execution of the studies, almost all of them are considered three months. It has been suggested, in some studies that can obtain results even with statistical significance, that it would require a longer-term monitoring study execution, between 6 and 12 months or the repetition of doses throughout the treatment to optimize the response [15-16].

Inflammatory markers in periodontal disease

The existence at the moment of an extensive bibliography about periodontal disease, as a potential risk factor for various organs and systems, has given rise to some authors such as Steven Offenbacher in 1996, who proposed a new discipline, the "Periodontal Medicine". This sale refers to the specialty that aims to study the relationship between periodontal pathologies and systemic diseases [17]. Saikku et al. [18] published the first articles, in which the link between bacterial infections and coronary heart disease is highlighted; also in 1995 Patel et al. [19] links chronic viral infections by Cytomegalovirus and Herpesvirus. Periodontal disease and arteriosclerotic processes appear related in the works of Mattila et al. [20], Beck et al. [21] and in 2007 by Gostman et al. [22], which indicate that periodontitis produces bacteremia, which

is manifested in an increase in proinflammatory markers, TNF α , IL-1, IL6 and hsCRP. Buhlin et al. [23], Gani et al. [24] and in 2010 Nakajima et al. [25] which refers to periodontitis is associated with limited levels of markers such as hsCRP and IL-6. Yoshii et al. [26] indicate that these levels do not precede periodontitis, but rise with it. D' Aiuto et al. [27], Behle et al. [28], observe a significant reduction in inflammatory markers after periodontal treatment; even of PAI-1, VCAM-1 and MMP-9. On the other hand, in 2001 Ridker et al. [29] study hsCRP as a predictor of cardiovascular risk and Tonetti et al. [30] demonstrates an improvement in endothelial dysfunction after periodontal treatment. All these studies and investigations can be interpreted as a link between periodontal disease and arteriosclerosis cardiovascular pathology.

Material and methods

Study population

A cross section of patients diagnosed with periodontitis was taken so as to be studied in a clinical trial with a therapeutic objective, which should allow after three months, evidence of the effectiveness of periodontal treatment. Topical doxycycline was applied as an adjuvant in order to optimize the results and achieve the objectives set; the work is structured in three parts.

The first part will have analytical purposes and will consist of a periodontal study, which will be performed at the time of diagnosis, as well as a blood test to determine the serum level of hsCRP and fibrinogen. The second part will have an interventionist character, in which all patients will undergo a non-surgical periodontal treatment, topical doxycycline will be applied in lesions ≥ 5 mm.

*Correspondence to: Ricardo Andreu, Dental Clinic, Paterna, Valencia, Spain, E-mail: r.andreu58@icloud.com

Key words: periodontal disease, periodontitis, inflammatory markers, topical doxycycline

Received: May 15, 2020; **Accepted:** June 15, 2020; **Published:** June 19, 2020

The third part will carry out a new periodontal study three months after having carried out the treatment, and the blood level of hsCRP and fibrinogen will be determined again.

Selection criteria

Inclusion criteria: patients with a Probing Depth > 3 mm in at least one probing site in two or more teeth, and/or loss of interproximal clinical insertion \geq 3 mm as criteria to diagnose the process as chronic periodontitis according to criteria of the AAP-EFP 2018 [31].

Exclusion criteria were: less than fourteen teeth, aggressive periodontitis, infectious or other inflammatory diseases, periodontal treatment in the last 6 months or antibiotics in the last 3 months, treatment with systemic anti-inflammatory drugs (NSAIDs), pregnancy or lactation, secondary obesity (hypothyroidism, Cushing's syndrome), or any medical condition requiring antibiotic treatment before the dental intervention

Results and discussion

Previous studies have also shown improvements in proinflammatory markers, IL-6 and α TNF in patients to whom topical doxycycline is applied [32-33], which consequently shows inflammation modulating actions in its local application, as previously observed after systemic administration at subtherapeutic doses [34-36].

The biochemical reevaluation shows, after three months, after non-surgical periodontal treatment and according to the Brunner-Langer non-parametric model, as fundamental findings, the reduction of serum fibrinogen levels in the group treated with doxycycline 364.5 ± 93.2 versus 347.0 ± 100.8 ($p = 0.077$), while in the control group the serum levels increased 314.8 ± 63.7 versus 320.4 ± 65.1 ($p = 0.305$). Plasma fibrinogen levels show, in our study, a positive correlation with the BOP index of probing bleeding at the limit of significance ($p = 0.051$), as an expression of the impact of local inflammation on the systemic inflammatory load. In the present study, our results can be interpreted by the presence of a residual inflammatory load, a result of the aggression caused by periodontal treatment, which would lead to an increase in acute phase reactants, including fibrinogen, and given the immunomodulatory properties of doxycycline, the final balance results in a decrease in the values of serum levels. On the other hand, in the present study, the levels of hsCRP remain unchanged 0.25 ± 0.22 versus 0.22 ± 0.22 ($p = 0.478$), in the group treated with doxycycline, in line with other studies, which neither showed changes [37-39].

Conclusion

As a general conclusion of the present study, it can be stated that the effects on systemic proinflammatory markers remain undetermined at least in the short term. More studies with prospective and longitudinal characteristics, of greater size and duration, are necessary, in order to objectify with more precision the influence of periodontal disease with systemic inflammation and, consequently, its relationship with cardiovascular pathology. Moreover, treatment with doxycycline does not seem to have benefits on the improvement of hsCRP. Finally, and as a contribution to the present study, there is a decrease in serum fibrinogen levels after non-surgical periodontal treatment with the use of doxycycline as an adjuvant medication. This implies an important benefit, as a result of the reduction of the peaks of systemic inflammation, caused because of the periodontal treatment.

Consent

As per international standard, patient's consent has been collected and preserved by the authors.

Ethical approval

As per international standard, written ethical approval has been collected and preserved by the author (s).

Competing interests

Authors have declared that no competing interests exist.

References

- Genco R, Hammond B (1994) Sensitivity of periodontal microorganisms to antibiotics and other antimicrobial agents. In: Genco R, Goldman H, Cohen W, editors. *Periodontics*. Mexico: Interamericana Mc Graw-Hill. p. 173-175. [[Crossref](#)]
- Seymour R, Heasman P (1995) Tetracyclines in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 22: 22-35. [[Crossref](#)]
- Ciancio S, Cobb C, Leung M (1994) Tissue concentration and localization of tetracycline following site specific tetracycline fiber therapy. *J Periodontol* 63: 849-853. [[Crossref](#)]
- Madison J, Hokett S (1997) The effects of different tetracyclines in the dentin root surface of instrumented periodontally involved human teeth: A comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol* 68: 739-741. [[Crossref](#)]
- Gupta, Souto ML, Ganhito JA, Holzhausen M, Chambrone L, Panuti CM (2016) Efficacy of Local Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Patients With Periodontitis and Diabetes: A Systematic Review. *J Periodontol* 87: 1406-1417. [[Crossref](#)]
- Drisko CH (1998) The use of locally delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol* 25: 947-52. [[Crossref](#)]
- Bogle G (1999) Locally delivered doxycycline hyclate: case selection, preparation, and application. *Compend Contin Educ Dent* 20: 26-33. [[Crossref](#)]
- Gupta R, Pandit R, Aggarwal S, Verma A (2008) Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 9: 25-32. [[Crossref](#)]
- Oringer RJ, Al-Shammari KF, Aldredge WA, Iacono VJ, Eber RM, et al. (2002) Effect of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption. *J Periodontol* 73: 835-842. [[Crossref](#)]
- Wilson TG Jr, McGuire MK, Greenstein G, Nunn M (1997) Tetracycline fibers plus scaling and root planing versus scaling and root planing alone: similar results after 5 years. *J Periodontol* 68: 1029-1032. [[Crossref](#)]
- Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Eickholz P, et al. (2012) Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 39: 475-482. [[Crossref](#)]
- Da Rocha HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, et al. (2015) Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol* 17: 82-90. [[Crossref](#)]
- Eickholz P, Kim TS, Bürklin T, Schacher B, Renggli HH, et al. (2002) Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: a double-blind randomized controlled multicenter study. *J Clin Periodontol* 29: 108-117. [[Crossref](#)]
- Wennström JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, et al. (2001) Utilization of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 28: 753-761. [[Crossref](#)]
- Martorelli de Lima AF, Cury CC, Palioto DB, Duro AM, Silva RCD, et al. (2004) Therapy with adjunctive doxycycline local delivery in patients with type 1 diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 31: 648-653. [[Crossref](#)]
- Deo V, Ansari S, Mandia S, Bhongade (2011). Therapeutic Efficacy of Subgingivally Delivered Doxycycline Hyclate as an Adjunct to Non-surgical Treatment of Chronic Periodontitis. *J Oral Maxillofac Res* 2: 3. [[Crossref](#)]
- Beck JD, Offenbacher S, William R, Gibas P, Garcia R (1998) Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol* 3: 127-41. [[Crossref](#)]

Andreu R (2020) Effects of topical doxycycline on inflammatory markers in periodontal disease

18. Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Huttunen JK, Leinonen M, et al. (1998) Serological evidence of and association of a novel Chlamydia with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2: 983-86. [[Crossref](#)]
19. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, et al. (1995) Association of Helicobacter Pylori and Chlamydia pneumonia infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 311: 711-14. [[Crossref](#)]
20. Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen M, Huttunen JK (1995) Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. *Clin Infect Dis* 20: 588-592. [[Crossref](#)]
21. Beck JD, Eke P, Lin D (2005) Associations between IgG antibody to oral organism and carotid intima media thickness in community dwelling adults. *Atherosclerosis* 183: 342-348. [[Crossref](#)]
22. Gostman I, Lotan CH, Soskolne WA, Rassovsky S, Pugatsch T, et al. (2007) Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol* 78: 849-858. [[Crossref](#)]
23. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, et al. (2009) Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol* 36: 541-549. [[Crossref](#)]
24. Gani DK, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P (2009) Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 13: 69-74. [[Crossref](#)]
25. Nakajima T, Honda T, Doman H, Okui T, Kajita K, et al. (2010) Periodontitis associated up regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontol* 45: 116-122. [[Crossref](#)]
26. Yoshii S, Tsuboi S, Morita I, Takami Y, Adachi K, et al. (2009) Temporal association of elevated C-reactive protein and periodontal disease in men. *J Periodontol* 80: 734-739. [[Crossref](#)]
27. D' Aiuto F, Nabali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS (2005) Short term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res* 84: 269-273. [[Crossref](#)]
28. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celentin R, et al. (2009) Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 36: 287-294. [[Crossref](#)]
29. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000) C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in woman. *N Engl J Med* 342: 836-843. [[Crossref](#)]
30. Tonetti MS, D' Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, et al. (2007) Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 356: 911-920. [[Crossref](#)]
31. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS (2018) Periodontitis case definition: Framework for staging and grading the individual periodontitis case. *J Clin Periodontol* 45: 149-161.
32. Madi M, Pavlic V, Samy W, Alagl A (2018) The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica* 76: 171-76. [[Crossref](#)]
33. Da Rocha HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, et al. (2015) Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol* 17: 82-90. [[Crossref](#)]
34. Emingil G, Gürkan A, Tervahartala T, Hernandez M, Özgül S, et al. (2019) Adjunctive Effects of a Sub-Antimicrobial Dose of Doxycycline on Clinical Parameters and Potential Biomarkers of Periodontal Tissue Catabolism. *Dent J* 7: 9. [[Crossref](#)]
35. Izuora KE, Ezeanolue EE, Neubauer MF, Gewelber CL, Allenback GL, et al. (2016) Changes in Inflammatory and Bone Turnover Markers After Periodontal Disease Treatment in Patients With Diabetes. *Am J Med Sc* 351: 589-94. [[Crossref](#)]
36. Bretz WA (2012) Low-dose doxycycline plus additional therapies may lower systemic inflammation in postmenopausal women with periodontitis. *J Evid Based Dent Prac* 12: 67-68. [[Crossref](#)]
37. Al-Isa M, Alotibi M, Alhashemi H, Althobiani F, Atia A, et al. (2019) Effect of nonsurgical periodontal therapy on the fibrinogen levels in chronic periodontitis patients. *Saudi Dent J* 31: 188-193. [[Crossref](#)]
38. Ide M, McPartlin D, Coward PY, Crook M, Lumb P, et al. (2003) Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol* 30: 334-340. [[Crossref](#)]
39. Altay U, Gürkan CA, Agbaht K (2013) Changes in inflammatory and metabolic parameters after periodontal treatment in patients with and without obesity. *J Periodontol* 84: 13-23. [[Crossref](#)]

Copyright: ©2020 Andreu R. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Inflammatory and prooxidant markers in response to periodontal treatment - A case report

Ricardo Andreu^{1,2*}, Sergio Santos-del-Riego³ and Francisco Payri³

¹Dental Clinic, Paterna, València, Spain

²Department of Physiotherapy Medicine and Biomedical Sciences, University of A Coruña, A Coruña, Spain

³CMT, Polytechnic University of València, València Spain

Abstract

Background: The aim of this study is to determine the changes in serum levels of malondialdehyde, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, hsCRP and fibrinogen as indicators of oxidative stress and inflammatory markers, in response to non-surgical periodontal treatment.

Case description: The patient, a 51-year-old male diagnosed with periodontitis was taken so as to be studied with a therapeutic objective, which should allow after three months the time of diagnosis and after non-surgical treatment. Topical doxycycline was used as adjunctive medication.

Conclusion: A significant reduction in both serum levels of pro-inflammatory markers and oxidative stress indicators is observed after periodontal treatment.

Introduction

Inflammatory markers

Different studies like Beck et al. [1] and Gostman et al. [2], indicate that periodontitis produces bacteremia, which is manifested in an increase in proinflammatory markers, TNF α , IL-1, IL6 and hsCRP. Buhlin et al. [3], Gani et al. [4] and in 2010 Nakajima et al. [5] refers to periodontitis is associated with limited levels of markers such as hsCRP and IL-6. On the other hand, D' Aiuto et al. [6] and Behle et al. [7], observe a significant reduction in inflammatory markers after periodontal treatment; even of PAI-1, VCAM-1 and MMP-9.

Previous studies have also shown improvements in proinflammatory markers, IL-6 and α TNF in patients to whom topical doxycycline is applied [8,9], which consequently shows inflammation modulating actions in its local application.

Prooxidant markers

The cells obtain energy through coupled oxidation-reduction (redox) reactions, during aerobic respiration. In this way, O₂ is responsible for the formation of the so-called reactive oxygen species or ROS, which are molecules of high reactivity by having a missing electron [10]. NADPH oxidase primarily, they are also important xanthine oxidase (XO) and decoupled endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [10] which promote ROS production and are involved in the development of vascular damage.

Inflammatory periodontal lesions present an important infiltrate of monocytes and macrophages, which has the purpose of containing the infectious process [11-17]. These defensive mechanisms will become an aggression for the periodontal tissues as a consequence of the production of free radicals (FR).

On the other hand, the nuclear factor NF κ b, which is inactive in plasma due to the inhibitor I κ b. The degradation of this subunit, which

is very sensitive to ROS, allows the promotion of the expression of genes that lead to the inflammatory response, this is a link between pro-oxidant states and chronic inflammatory processes [18].

When the free radicals react with a fatty acids molecule of the cellular lipid membranes [19], malondialdehyde (MDA) is generated, which is an indicator of tissue damage [20]. Another molecule that is damaged by free radicals is DNA, as a consequence of the arrival of ROS inside the cell nucleus, the action of the radical OH \cdot is able to originate more than 20 modifications in the nitrogenous bases. We can highlight 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is produced as a result of the interaction with guanine. It can be used like a marker of oxidative damage [21-29].

Therefore, serum concentrations of MDA and 8-OH-dG are increased in patients with periodontal disease as an expression of increased oxidative stress in the etiology of the lesions and their quantification, consequently, it will allow us to assess the prooxidant state.

Case description

The patient diagnosed with periodontitis was taken to be studied with a therapeutic objective, which should allow after three months, evidence of the effectiveness of periodontal treatment. Topical doxycycline was applied as an adjuvant in order to optimize the results and achieve the objectives set.

*Correspondence to: Ricardo Andreu, Dental Clinic, Paterna, València, Spain, E-mail: r.andreu58@icloud.com

Key words: periodontal disease, periodontitis, inflammatory markers, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosine, malondialdehyde, oxidative stress

Received: September 10, 2020; **Accepted:** September 22, 2020; **Published:** September 28, 2020

Methodology

The work is structured in three parts:

The first part will have analytical purposes and will consist of a periodontal study, which will be performed at the time of diagnosis, as well as a blood test to determine the serum level of hsCRP, fibrinogen, MDA and 8-OH-dG in urine.

The second part will have an interventionist character, in which all patients will undergo a nonsurgical periodontal treatment, topical doxycycline will be applied in lesions ≥ 5 mm.

The third part will carry out a new periodontal study three months after having carried out the treatment, level of hsCRP, fibrinogen, MDA and 8-OH-dG, will be determined again.

Results

A 51-year-old male, non-smoker, with no relevant pathological history, diagnosed with periodontal disease. The cut-off point for PD ≥ 3 mm is the one most commonly used in the literature and in this study the CAL value ≥ 3 mm is used to establish the diagnosis according to the 2018 AAP-EFP criteria [30].

Underwent non-surgical periodontal treatment; the treatment in a single session or "full mouth" with the use of antiseptics and/or topical antibiotics in our case, have amply demonstrated clinical benefits [31], with topical application of doxycycline in periodontal lesions ≥ 5 mm and prospective follow-up, determining both clinical and biochemical parameters at the baseline and three months after the end of the treatment.

Baseline values. Clinical parameters: PD (mm) 3.47; CAL (mm) 3.77; % PD 4 (mm) 59; % PD 6 (mm) 4.86; BOP % 27.27.

Biochemical parameters: hsCRP (mg/L) 0.28; Fibrinogen (mg/dL) 260; MDA ($\mu\text{mol/L}$) 1.1; 8-OH-dG ($\mu\text{g/g}$) 11.9.

Re-evaluation. Clinical parameters: PD (mm) 3.29; CAL (mm) 3.60; % PD 4 (mm) 51; % PD 6 (mm) 3.47; BOP% 18.75.

Biochemical parameters: hsCRP (mg/L) 0.18; Fibrinogen (mg/dL) 214; MDA ($\mu\text{mol/L}$) 0.7; 8-OH-dG ($\mu\text{g/g}$) 6.1.

Observed variation. Clinical parameters: PD (mm) -0.18; CAL (mm) -0.17; % PD 4 (mm) -8; % PD 6 (mm) -1.39; BOP% -8.52.

Biochemical parameters: hsCRP (mg/L) -0.1; Fibrinogen (mg/dL) -46; MDA ($\mu\text{mol/L}$) -0.4; 8-OH-dG ($\mu\text{g/g}$) -5.8.

Discussion

The values of all the clinical parameters studied improve with respect to those observed at baseline, highlighting the decrease in the BOP index of 8.52%. The determination of the BOP index, as an indicator of local inflammation, allows us, by contrasting it with the determinations of the biochemical parameters, to show its influence on the systemic inflammatory load and especially with the serum fibrinogen level [32].

A significant reduction in both serum levels of pro-inflammatory markers and oxidative stress indicators is observed after non-surgical periodontal treatment, especially fibrinogen in -46 (mg/dL) and of 8-OH-dG in -5.8 ($\mu\text{g/g}$).

Previous studies have also shown improvements in pro-inflammatory markers, IL-6, αTNF and oxidative stress [33,34] in patient receiving topical doxycyclin [35,36].

The application of topical doxycycline can contribute in this way by modulating actions of inflammation on its local application, as has been previously observed after its systemic administration at sub-therapeutic doses [37- 39].

In the present study, our results can be interpreted by the presence of a residual inflammatory load, a result of the aggression caused by periodontal treatment, which would lead to an increase in pro-inflammatory and oxidative stress markers, among them fibrinogen stands out and that given the immunomodulatory properties of doxycycline, the final balance results in a decrease in the values of serum levels of the different markers.

In summary, more studies with prospective and longitudinal characteristics, of greater size and duration, are necessary in order to more accurately objectify the influence of periodontal disease with systemic inflammation and, as a consequence, its relationship especially with chronic pathologies.

Conclusion

As a general conclusion of the present study, it can be affirmed that, as a consequence of periodontal treatment, there is a generalized improvement in clinical variables, pro-inflammatory markers and systemic pro-oxidants, at least in the short term.

This represents an important benefit, as a result of the reduction of the inflammatory load and systemic oxidative stress, with the consequent benefits for general health, without forgetting the alteration of the affinity for the nitrogenous bases of the oxidation products of guanine and therefore its possible mutagenic character.

Consent

As per international standard, patient's consent has been collected and preserved by the authors.

Ethical approval

As per international standard, written ethical approval has been collected and preserved by the author (s).

Competing interests

Authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Beck JD, Eke P, Lin D (2005) Associations between IgG antibody to oral organism and carotid intima media thickness in community dwelling adults. *Atherosclerosis* 183: 342-348. [[Crossref](#)]
2. Gostman I, Lotan CH, Soskolne WA, Rassovsky S, Pugatsch T, et al. (2007) Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol* 78: 849-858. [[Crossref](#)]
3. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, et al. (2009) Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol* 36: 541-549. [[Crossref](#)]
4. Gani DK, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P (2009) Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 13: 69-74. [[Crossref](#)]
5. Nakajima T, Honda T, Doman H, Okui T, Kajita K, et al. (2010) Periodontitis associated up regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontol* 45: 116-122. [[Crossref](#)]
6. D' Aiuto F, Nabali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS (2005) Short term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res* 84: 269-273. [[Crossref](#)]
7. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celentini R, et al. (2009) Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 36: 287-294. [[Crossref](#)]

Andreu R (2020) Inflammatory and prooxidant markers in response to periodontal treatment - A case report

8. Madi M, Pavlic V, Samy W, Alagil A (2018) The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica* 76: 171-176. [Crossref]
9. Da Rocha HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, et al. (2015) Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol* 17: 82-90. [Crossref]
10. Weswler AR, Bast A (2010) Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Current Hypertens Reports* 12: 154-161. [Crossref]
11. Guarnieri C, Zuchelli G, Bernard F, Scheda M, Frezza R (1989) Polymorphonuclear neutrophilic granulocytes and the defense and damage of periodontal tissues. *Minerva Stomatol* 38: 783-794. [Crossref]
12. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A (1991) Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 18: 44-48. [Crossref]
13. Guarnieri C, Zuchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, et al. (1991) Enhancer peroxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun* 15: 11-16. [Crossref]
14. Gustafsson A, Asman B (1996) Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta-receptor stimulation. *J Clin Periodontol* 23: 38-44. [Crossref]
15. Ward PA (1998) Oxygen radicals inflammations and the tissue injury. *Free Rad Biol Med* 5: 403-408.
16. Over C, Yamalik N, Yavuzylmaz E, Ersoy F, Eratalay K (1993) Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. *J Nihon Univ Sch Dent* 35: 235-240. [Crossref]
17. Firatli E, Unal T, Onan U, Sandai P (1994) Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 21: 680-683. [Crossref]
18. Bierhaus P, Schiekofer S, Schwanninger M, Andrassy M, Humpert P, et al. (2001) Diabetes associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kb. *Diabetes* 50: 2792-2802. [Crossref]
19. Voskresenskii ON, Tkachenko EK (1991) The role of lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontitis. *Stomatologii Mosk* 4: 5-10. [Crossref]
20. Kirkpatrick DT, Guth DJ, Malvis RD (1996) Detection of in vivo lipid peroxidation using thiobarbituric acid assay for lipid hydroperoxides. *J Biochem Toxicol* 1: 93-104. [Crossref]
21. Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, et al. (2003) Oxidative stress-related alteration of the copy number of Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl(4) poisoning? *Free Radic Biol Med* 38: 698-710. [Crossref]
22. Kouda K, Nakamura H, Fan W, Horiuchi K, Takeuchi H (2001) The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine. *Clin Biochem* 34: 247-50. [Crossref]
23. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. (2005) 6 Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl(4) poisoning? *Free Radic Biol Med* 38: 698-710. [Crossref]
24. Jaruga P, Dizdaroglu M (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 24: 1389-1394. [Crossref]
25. Guyton KZ, Kensler TW (1993) Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Brit Med Bul* 49: 523-544. [Crossref]
26. Ohkawa H (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by TBA reaction. *Anal Biochem* 58: 95-351. [Crossref]
27. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Health C, Part C* 27: 120-139. [Crossref]
28. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, et al. (1998) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424: 9-21. [Crossref]
29. Schmerld I, Niedermuller H (2001) Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp Gerontol* 36: 1375-86. [Crossref]
30. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS (2018) Periodontitis case definition: Framework for staging and grading the individual periodontitis case. *Journal of Clinical Periodontology* 45: 149-161. [Crossref]
31. Fang H, Han M, Li QL, Cao CY, Xia R, et al. (2016) Comparison of a full- mouth disinfection and quadrant-wise scaling in the treatment of adult chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res* 51: 417-430. [Crossref]
32. Andreu R (2020) Effects of topical doxycycline on inflammatory markers in periodontal disease. *Clin Sci Res Rep* 3: 1-3.
33. Muthuraj MSA, Janakiram S, Chithresan K, Maradi AP, Maddur PK, et al. (2017) Effect of scaling and root planing on levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients with and without Type II diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol* 21: 201-206. [Crossref]
34. Bansal N, Gupta ND, Bey A, Sharma VK, Gupta N, et al. (2017) Impact of nonsurgical periodontal therapy on total antioxidant capacity in chronic periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol* 21: 291-95. [Crossref]
35. Marwa M, Verica P, Wael S, Adel A (2018) The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica* 76: 171-176. [Crossref]
36. Da Rocha HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, et al. (2015) Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *J Int Acad Periodontol* 17: 82-90. [Crossref]
37. Emingil G, Gurkan A, Tervahartiala T, Hernandez M, Ozgul S, et al. (2019) Adjunctive Effects of a Sub-Antimicrobial Dose of Doxycycline on Clinical Parameters and Potential Biomarkers of Periodontal Tissue Catabolism. *Dent* 7: 9. [Crossref]
38. Izuora KE, Ezeanolue EE, Neubauer MF, Gewelber CL, Allenback GL, et al. (2016) Changes in Inflammatory and Bone Turnover Markers After Periodontal Disease Treatment in Patients with Diabetes. *Am J Med Sci* 351: 589-594. [Crossref]
39. Bretz WA (2012) Low-dose doxycycline plus additional therapies may lower systemic inflammation in postmenopausal women with periodontitis. *J Evid Based Dent Pract* 12: 67-68. [Crossref]

Copyright: ©2020 Andreu R. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Anexo III. PUBLICACIONES

III. 2 Publicación Journal Citation Reports

Andreu R, Santos-Del-Riego S, Payri F. Serum inflammatory and prooxidant marker levels in different periodontal disease stages. *Healthcare*. 2021;9(8):1070.

Factor de impacto (2020): 2,645

Cuartil:

- Categoría Health Care Sciences & Services – Science Citation Index Expanded: Q3 (57/107)
- Categoría Health Policy & Services – Social Sciences Citation Index: Q2 (40/88)

Article

Serum Inflammatory and Prooxidant Marker Levels in Different Periodontal Disease Stages

Ricardo Andreu ^{1,*}, Sergio Santos-del-Riego ¹ and Francisco Payri ²

¹ Investigation Unit in Integration and Health Promotion (INTEGRA SAÚDE), Department of Physiotherapy, Medicine and Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of A Coruña, 15071 A Coruña, Spain; sergio.santos.delriego@udc.es

² CMT, Polytechnic University of Valencia, Camí de Vera, 46022 Valencia, Spain; fpayri@mot.upv.es

* Correspondence: r.andreu@udc.es; Tel.: +34-961384415

Abstract: Background: Periodontitis has been associated to systemic diseases and this association could be due to an increase in circulating inflammatory and oxidative stress biomarkers in the periodontal disease. This study aimed to evaluate the relationship between inflammatory and prooxidant markers according to different stages of periodontitis. Methods: This cross-sectional study included 70 subjects who were divided into three groups according to periodontitis stage: stage II (n = 22), stage III (n = 30), and stage IV (n = 18). We evaluated periodontal parameters and levels of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), fibrinogen, and malondialdehyde (MDA) in serum, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine. Results: Serum hsCRP and fibrinogen levels were associated with periodontitis severity, which were higher in stage IV than in stages III and II of periodontitis ($p = 0.003$ and $p = 0.025$, respectively). We observed a slight yet insignificant increase in MDA levels related to periodontitis severity. Probing depth and clinical attachment loss were associated with serum fibrinogen and hsCRP levels. However, there were no significant associations between periodontal variables and MDA and 8-OHdG levels. Conclusion: Our data support an association between periodontitis and systemic inflammation, which increases with periodontal disease severity. This indicates the importance of the early diagnosis and treatment of periodontal disease to avoid the development or worsening of systemic inflammatory diseases.

Keywords: periodontal diseases; periodontitis; inflammation; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; malondialdehyde; oxidative stress



Citation: Andreu, R.; Santos-del-Riego, S.; Payri, F. Serum Inflammatory and Prooxidant Marker Levels in Different Periodontal Disease Stages. *Healthcare* **2021**, *9*, 1070. <https://doi.org/10.3390/healthcare9081070>

Academic Editors: Takahiro Kanno and Shintaro Sukegawa

Received: 11 July 2021
Accepted: 19 August 2021
Published: 20 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Periodontitis is a very prevalent chronic disease that ranks sixth among the most common pathologies that affect humans [1]. Recently, many publications have reported that periodontitis is related to various systemic diseases, such as cardiovascular diseases [2]. Various systemic pathologies are linked to periodontitis through low-grade chronic inflammation [3,4].

Acute phase reactants, such as high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and fibrinogen, are proteins whose plasma concentrations increase or decrease by at least 25% during inflammatory processes [5]. These proteins are produced by the liver following the stimulation of proinflammatory cytokines synthesised by endothelial cells. hsCRP levels are used to determine serum CRP concentrations lower than 1 mg/dL to discriminate small increases due to subclinical inflammatory processes [6]. Moreover, hsCRP is used to assess cardiovascular risk [7]. Fibrinogen can increase between 2 and 20 times if there are inflammatory processes [6].

Polymorphonuclear neutrophils, fundamental innate immune response cells, generate proinflammatory cytokines, metalloproteinases, and reactive oxygen species (ROS), which are crucial in the development and progression of periodontal damage [8]. Accordingly,

malondialdehyde (MDA) is an organic compound resulting from the oxidation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes. MDA is generated when a hydroxide radical interacts with lipids, captures a hydrogen atom from the methylene carbon, and causes a very unstable lipid radical, which consequently reacts with another lipid and causes a chain reaction leading to the formation of highly toxic aldehydes [9,10]. In the cell nucleus and mitochondria, oxidative damage to DNA produces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is a predominant form of deoxyguanosine resulting from guanine oxidation. 8-OHdG urine quantification estimates DNA damage caused by both endogenous and exogenous agents [11].

Over the past few years, numerous clinical and basic experimental studies have shown a strong association between oxidative stress and periodontitis, but most of these periodontal studies evaluated total antioxidant capacity, total oxidant status, and oxidative stress index [12]. However, other recent studies evaluated oxidative stress markers, such as MDA and 8-OHdG levels, but mainly at the local level in saliva [13–16] and gingival crevicular fluid [14,17] and only a few studies evaluated MDA and 8-OHdG levels in serum [13,18,19]. Although these studies have different results, associations between periodontitis and MDA and 8-OHdG levels have been observed [18–20]. Thus, the association between periodontitis and circulating oxidative stress biomarkers could indicate that periodontitis could contribute to the development and progression of several systemic inflammatory diseases [21], whether mitochondrial dysfunction is triggered due to an exacerbated inflammatory process [22]. Therefore, this study aimed to evaluate the relationship between inflammatory and pro-oxidant markers according to different periodontitis stages to determine whether an advanced stage of periodontitis could affect the systemic health of patients.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Study participants aged between 30 and 75 years were consecutively recruited at our private dental clinic (Paterna, Valencia, Spain) between June 2019 and March 2020 for this cross-sectional study. Participants were diagnosed with periodontitis when an interdental clinical attachment loss (CAL) in ≥ 2 non-adjacent teeth or a buccal or oral CAL ≥ 3 mm with pocketing >3 mm in ≥ 2 teeth is detected according to the 2017 World Workshop definition [23]. Exclusion criteria were fewer than 14 teeth, infectious or other oral inflammatory diseases, comorbidities such as diabetes or obesity, receipt of periodontal treatment in the last 6 months or antibiotics in the previous 3 months, being under systemic anti-inflammatory treatment, pregnancy, lactation, severe disease including malignancies, alcohol, or drug abuse. Data on smoking were recorded.

This human observational study was conducted according to Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines and is in accordance with the ethical principles stated in the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the ethics committee of the Arnau de Vilanova-Lliria (Valencia, Spain) hospital (protocol RAM-LIG-2019-01), and all participants gave written informed consent.

2.2. Clinical Periodontal Determinations

Periodontal examinations were conducted by an experienced dentist (R. Andreu). Periodontal assessments included measurements of probing depth (PD), CAL, number of sites with PD ≥ 4 mm, percentage of sites with PD 1–3 mm, 4–5 mm, and ≥ 6 mm, gingival bleeding on probing (BOP), and plaque index, which were recorded using a manual periodontal probe PCP UNC-15 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). PD, CAL, and BOP were measured at six sites per tooth for all teeth, excluding third molars. PD was measured as the distance between the gingival margin and the clinical pocket base, CAL was recorded as the distance between the cemento–enamel junction and the clinical pocket base, with both values expressed in millimetres, and the BOP percentage was calculated by dividing the number of sites with BOP by the number of sites explored and multiplying

this value by 100. We assessed the Silness and Løe simplified Plaque Index and scored it in six representative Ramfjörd teeth: upper right first molar, upper left central incisor, upper left first premolar, lower left first molar, lower right central incisor, and lower right first premolar. Participants were classified according to three periodontitis stages according to the 2017 World Workshop definition [23]. Subjects were classified as having stage II when interdental CAL at site of greatest loss was 3 to 4 mm and maximum PD \leq 5 mm, stage III when CAL \geq 5 mm, PD \geq 6 mm and tooth loss due to periodontitis of \leq 4 teeth, and stage IV when CAL \geq 5 mm, PD \geq 6 mm and tooth loss due to periodontitis of \geq 5 teeth.

2.3. Biochemical Determinations

Venous blood and urine samples were analysed at the Analclinic Laboratory (Mislata-Valencia, Spain). Serum samples were obtained to measure hsCRP and fibrinogen levels as inflammatory markers and acute phase reactants, and malondialdehyde (MDA) levels as oxidative stress markers. Serum hsCRP levels (mg/dL) were quantified using an immunonephelometric assay (Dade Behring, Marburg, Germany), fibrinogen levels (mg/dL) were obtained through the Coagulometry-Thrombin-Clauss time technique using a Solea 100 automatic analyser (Biolabo diagnostics, Maizy, France), and MDA levels (μ mol/L) were obtained by the Asakawa-Matsushita method by reacting MDA with 2-thiobarbituric acid, giving a coloured MDA-TBA complex that is quantified using a Uvikon-810 spectrophotometer (Kontron Instruments, Augsburg, Germany). 8-OHdG levels (μ g/g creatinine) were tested from urine samples using high-performance liquid chromatography (Analytical HPLC 1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), which is also an oxidative stress marker.

2.4. Statistical Analysis

In reference to sample size determination, the present study was designed in a finite population. Thus, in our case, taking into account that the flow of patients during the selection period can be estimated at 90 periodontal patients/year in the clinic, as well as considering a power of 95% in order to be able to detect differences of \geq 0.25 mg/dL between the groups in relation to the primary efficacy criterion (serum hsCRP levels variation), assuming a common standard deviation of 0.20 mg/dL and with an α risk of 0.05. Under these premises, at least 69 subjects were required.

Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM Co., Armonk, NY, USA). Continuous variables were expressed as mean and standard deviation for parametric data, qualitative data were expressed as percentages, and proportions were compared using a chi-square test. Continuous variables were compared among groups according to periodontitis stages using a one-way analysis of variance or Kruskal–Wallis test, followed in each case by a post-hoc test. Spearman's correlation coefficient was used to evaluate the strength of the association between periodontal, inflammatory, and oxidative stress variables. A multivariable regression model was used to evaluate the relationship between two or more explanatory variables, considered as independent variables, and a response variable, considered as a dependent variable, using a stepwise method. A confidence interval of 95% was determined for all tests and a p -value $<$ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

This cross-sectional study analysed 70 subjects with periodontitis. Of these subjects, 27 were men, and 43 were women. Participants were classified according to three periodontitis stages; 22 subjects were classified as having stage II, 30 as having stage III, and 18 as having stage IV, according to the 2017 World Workshop definition [23].

Participant demographic and periodontal parameters are presented in Table 1. No significant differences were found between groups regarding sex. Mean study population age was 53.7 ± 9.3 years, and although the group with advanced periodontitis had a slightly older age, no significant differences were observed between groups regarding age ($p = 0.055$). Most patients in this study did not smoke (65.7%), and no differences

were observed in the smoking rate among the three groups as assessed by a chi-square test ($p = 0.134$). Regarding periodontal clinical parameters, PD and CAL progressively worsened with periodontitis severity. Moreover, BOP and the number and percentage of sites with periodontal pockets were higher in patients with stage III and IV periodontal disease than in patients with stage II, whereas the percentage of healthy periodontal sites (PD 1–3 mm) was higher in patients with stage II periodontitis than in patients with stage III and IV. The plaque index was similar between groups ($p = 0.554$).

Table 1. Descriptive study population parameters according to periodontitis stages.

	Periodontitis			
	Stage II	Stage III	Stage IV	All
Demographic parameters				
n (% females)	22 (21.4)	30 (24.3)	18 (15.7)	70 (61.4)
Age (years)	52.5 ± 10.4	51.9 ± 9.0	58.2 ± 7.2	53.7 ± 9.3
Smoking habit				
Non-smokers % (n)	20.0 (14)	28.6 (20)	17.1 (12)	65.7 (46)
Smokers ≤10 cigarettes/day	10.0 (7)	4.3 (3)	2.9 (2)	17.1 (12)
Smokers >10 cigarettes/day	1.4 (1)	10.0 (7)	5.7 (4)	17.1 (12)
Periodontal parameters				
PD (mm)	2.64 ± 0.35 ^a	3.51 ± 0.68 ^b	3.92 ± 0.65 ^c	3.34 ± 0.77 ^{***}
CAL (mm)	2.80 ± 0.35 ^a	3.68 ± 0.65 ^b	4.16 ± 0.68 ^c	3.53 ± 0.78 ^{***}
Sites PD ≥ 4 mm (n)	27.6 ± 18.8 ^a	68.6 ± 30.6 ^b	64.0 ± 23.6 ^b	54.5 ± 31.3 ^{***}
Sites PD 1–3 mm (%)	82.7 ± 11.6 ^a	55.7 ± 19.2 ^b	47.6 ± 17.5 ^b	62.1 ± 21.9 ^{***}
Sites PD 4–5 mm (%)	16.6 ± 11.8 ^a	31.7 ± 12.2 ^b	36.9 ± 11.6 ^b	28.3 ± 14.3 ^{***}
Sites PD ≥ 6 mm (%)	1.07 ± 0.85 ^a	12.3 ± 10.6 ^b	15.6 ± 9.4 ^b	9.61 ± 10.2 ^{***}
BOP (%)	21.4 ± 17.2 ^a	32.4 ± 21.3 ^{a,b}	44.4 ± 32.4 ^b	32.0 ± 24.8 ^{**}
Plaque index (A.U)	0.71 ± 0.75	0.72 ± 0.63	0.93 ± 0.91	0.77 ± 0.74

Notes: PD, probing depth; CAL, clinical attachment loss; BOP, bleeding on probing; and A.U, arbitrary units. Data are presented as mean ± standard deviation or percentages (n). ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ when patients with different periodontitis stages were compared with an analysis of variance test. Values with different superscript letters (^a, ^b and ^c) were significantly different when the three groups were compared using a Student–Newman–Keuls post-hoc test. Hence, means with the same superscript letters are not significantly different ($p > 0.05$), while means that have no superscript letters in common are significantly different ($p < 0.05$).

To investigate whether proinflammatory and prooxidative parameters worsen with periodontitis severity, we compared these variables among the three study groups according to periodontitis stage (Figure 1). Systemic inflammatory markers, hsCRP, and fibrinogen, considered as acute phase reactants, were significantly different between groups ($p = 0.003$ and $p = 0.025$, respectively), with higher values in the advanced periodontitis group (stage IV) (Figure 1A,B) than in the other two groups. Mean hsCRP in stage IV 0.463 ± 0.390 mg/dL vs. 0.224 ± 0.203 mg/dL in stage III and 0.210 ± 0.145 mg/dL in stage II. Likewise, mean fibrinogen levels in stage IV 390.6 ± 68.8 mg/dL vs. 338.5 ± 76.5 mg/dL in stage III and 332.2 ± 67.7 mg/dL in stage II. In addition, we determined prooxidative parameter levels, including serum MDA levels and urine 8-OHdG levels. We observed a slight and progressive yet insignificant increase in MDA levels as periodontitis severity increased (0.66 ± 0.18 μ mol/L in stage II; 0.71 ± 0.2 μ mol/L in stage III; and 0.73 ± 0.26 μ mol/L in stage IV. Figure 1C). Likewise, no differences were observed in 8-OHdG urine levels between groups (10.9 ± 3.05 μ g/g in stage II; 9.17 ± 2.05 μ g/g in stage III; and 9.84 ± 3.21 μ g/g in stage IV. Figure 1D).

Correlation coefficients between periodontal, inflammatory, and pro-oxidant parameters from all population are shown in Table 2. PD and CAL, which are periodontal clinical parameters that indicate disease and periodontitis severity, were positively correlated with hsCRP ($r = 0.216$, $p = 0.037$; and $r = 0.234$, $p = 0.026$, respectively) and fibrinogen levels ($r = 0.320$, $p = 0.007$; and $r = 0.335$, $p = 0.002$, respectively), suggesting a major inflammatory periodontitis component. Moreover, fibrinogen was positively correlated with BOP and

the percentage of sites with PD \geq 6 mm and negatively correlated with the percentage of sites with PD 1–3 mm. In addition, there was a correlation between both proinflammatory parameters, hsCRP, and fibrinogen. Regarding oxidative stress parameters, no correlations were observed between clinical periodontal parameters and serum MDA and urine 8-OHdG levels. However, when we studied bivariate correlations segmenting participants by periodontitis stages, we observed a statistically significant positive correlation between MDA and BOP in patients with stage II periodontitis ($r = 0.707$, and $p = 0.025$). Finally, we detected bivariate correlations between all analysed periodontal parameters except the plaque index, which was not significantly correlated with CAL and the percentage of sites with PD \geq 6 mm (data not shown).

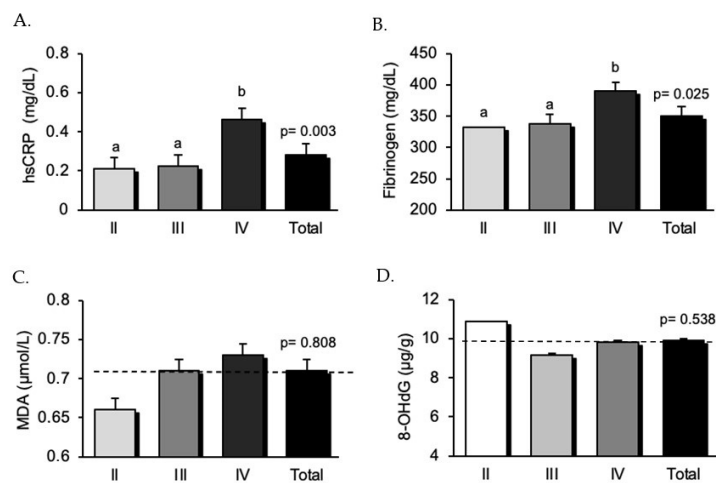


Figure 1. Study population inflammatory and oxidative stress parameters according to periodontitis stages. Serum high-sensitivity C-reactive protein (A), fibrinogen (B) and malondialdehyde (C), and urine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (D) levels. Notes: hsCRP, high-sensitive C-reactive protein; MDA, malondialdehyde; and 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. Data are presented as mean \pm standard error. Values with different superscript letters (a and b) were significantly different ($p < 0.05$) when the data of patients with different periodontitis stages were compared using a one-way analysis of variance followed by a Student–Newman–Keuls post-hoc test. Hence, means with the same superscript letters are not significantly different ($p > 0.05$), while means with no superscript letters in common are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Spearman’s correlation coefficients between periodontal, inflammatory, and oxidative stress parameters.

	hsCRP		Fibrinogen		MDA		8-OHdG	
	r	p	r	p	r	p	r	p
PD	0.216	0.037	0.320	0.007	−0.245	0.183	−0.030	0.876
CAL	0.234	0.026	0.335	0.005	−0.229	0.214	−0.041	0.831
n Sites PD \geq 4 mm	0.044	0.717	0.226	0.062	−0.142	0.445	−0.061	0.751
% Sites PD 1–3 mm	−0.119	0.330	−0.264	0.028	0.190	0.305	0.076	0.695
% Sites PD 4–5 mm	0.113	0.353	0.231	0.056	0.009	0.960	0.025	0.898
% Sites PD \geq 6 mm	0.188	0.121	0.263	0.029	−0.186	0.315	−0.032	0.869
% BoP	0.137	0.261	0.311	0.009	0.062	0.740	0.046	0.814
Plaque index	0.043	0.726	−0.057	0.644	0.237	0.199	−0.048	0.806
hsCRP	—	—	0.490	<0.001	0.191	0.302	−0.137	0.478
Fibrinogen	0.490	<0.001	—	—	−0.098	0.605	−0.204	0.290
MDA	0.191	0.302	−0.098	0.605	—	—	0.244	0.202
8-OHdG	−0.137	0.978	−0.204	0.290	0.244	0.202	—	—

Notes: PD, probing depth; CAL, clinical attachment loss; BOP, bleeding of probing; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; MDA, malondialdehyde; and 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. Values in bold represent statistically significant correlations ($p < 0.05$).

As fibrinogen showed significant correlations with several periodontal parameters, we aimed to analyse these associations using a multivariate linear regression analysis. In the multivariable regression model, the association between fibrinogen and correlated variables was evaluated as a potentially independent predictor using the stepwise method. Results showed that hsCRP ($\beta = 0.441$) and CAL ($\beta = 0.280$) were independently associated with fibrinogen serum levels; this explained 30% of the dependent variable (Table 3).

Table 3. Stepwise multivariable regression model with fibrinogen as a dependent variable.

Dependent Variable	Independent Variables	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	p-Value
		B	SE	β	
Fibrinogen	hsCRP	11.96	2.83	0.441	<0.001
	CAL	26.14	9.74	0.280	0.009
	Multiple R square adjusted			0.304	
	R			0.570	
	p			<0.001	

PD, BOP, percentage of sites with PD 1–3 mm, and PD ≥ 6 mm were excluded from the model because they were not significant predictors ($p > 0.05$). Notes: hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; CAL, clinical attachment loss; PD, probing depth; and BOP, bleeding on probing.

4. Discussion

This study has demonstrated that serum hsCRP and fibrinogen levels are associated with periodontal disease and both parameters increase with periodontitis severity. In this study, we observed a slight and progressive yet insignificant increase in MDA levels as periodontitis severity increased. Likewise, we did not find associations between periodontal parameters and systemic MDA and 8-OHdG levels.

Previous studies suggested a multidirectional association between periodontitis and inflammatory systemic diseases [24]; thus, patients with periodontitis are at greater risk of developing and/or exacerbating diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, and cardiovascular diseases, among other conditions [25]. However, these associations remain controversial.

Several epidemiological studies have reported that periodontitis is related to atherosclerotic events, and this association has been suggested due to the increase in serum levels of proinflammatory and pro-oxidant markers in both diseases, such as TNF α , IL-1, IL-6, and CRP [26–29], fibrinogen [30], MDA [18,25], and 8-OHdG [13,31]. Recently, a study has even shown that periodontitis—especially severe—is independently associated with a considerable increase in platelet count due to an increase in the systemic inflammation, which could be a new potential link with cardiovascular disease [32]. On the contrary, some studies suggest that this association is mainly due to the existence of common risk factors [33,34]. Some studies only observed an increase in hsCRP levels in some individuals with periodontitis [33], and in other studies, it has been observed that patients with periodontitis showed similar levels of hsCRP in serum compared to edentulous individuals [34]. However, a large number of previous epidemiological studies have shown an association between periodontal and proinflammatory parameters [26–30,35,36], suggesting the possible systemic repercussions that local chronic inflammation could increase the systemic inflammatory burden. In addition, previous studies have shown that non-surgical periodontal therapy was effective in reducing the plasma levels of hsCRP and fibrinogen [37,38]. In line with these findings, in this study, we observed that both serum hsCRP and fibrinogen increased with periodontitis severity. Furthermore, we observed positive associations between periodontal clinical parameters and both inflammatory parameters, especially fibrinogen. When we applied the stepwise method with fibrinogen as the dependent variable and all variables correlated with fibrinogen as independent variables, we observed a significant relationship between hsCRP and CAL, showing the interconnection between different systemic inflammation markers and probing dependent variables with a cumulative profile.

Therefore, we suggest that determining serum hsCRP and fibrinogen levels in patients with periodontitis, especially in those with stage III or IV of periodontitis, can be very useful for predicting cardiovascular results. hsCRP is very useful as it represents a global measure of endothelial function [39], and fibrinogen strongly affects blood coagulation, blood rheology, and platelet aggregation and directly affects the vascular wall. All these phenomena might constitute the pathophysiological mechanisms involved in the association between these prominent acute-phase reactants and cardiovascular events [40]. Thus, a possible mechanism potentially linking periodontitis to atherosclerosis is the dumping of inflammatory mediators originating from periodontal lesions into systemic circulation. Such inflammatory mediators, including CRP, matrix metalloproteinases, fibrinogen, and other haemostatic factors, may further accelerate atheroma formation and progression mainly through oxidative stress and inflammatory dysfunction [41].

Most previous periodontal studies evaluated oxidative stress through the global burden of ROS and guanine-derived biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid [42–44]. However, in this current study, we evaluated fluctuations in both markers in blood and urine; these fluctuations are more commonly related to systemic oxidative damage markers associated with periodontal diseases, such as MDA and 8-OHdG [13,18,19,45–48].

In a recent meta-analysis, most studies on periodontitis and oxidative stress found a significant increase in MDA levels in the saliva and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis compared to non-periodontitis patients [14]. However, in this systematic review, no data on serum MDA levels were collected. In this study, we evaluated MDA levels in serum samples. Although we did not observe statistically significant differences in serum MDA levels among groups with different periodontitis stages, a slight increase in MDA levels can be seen as periodontitis severity increases. Nonetheless, we did not observe significant correlations between periodontal parameters and serum MDA levels. Similar to our study, a previous study did not observe an association between periodontitis and serum MDA levels, although it showed higher saliva MDA levels in patients with periodontitis and a significant correlation between these saliva MDA levels and periodontal parameters [49]. The lack of an association between serum MDA levels and periodontal parameters in this study may be because this oxidative stress parameter was evaluated in a small representative study population sample. Nevertheless, it is worthy to note that a surprising association was found between MDA and BOP when a correlation analysis segmenting the population by stages of periodontitis was performed. Similar to this result, BOP showed a moderate positive correlation with serum MDA levels in a previous study [50]. Gingival bleeding on probing is a sign of local inflammation and periodontal destruction, which can increase proinflammatory marker and oxidative damage systemic levels.

The most frequent oxidative DNA modification usually occurs at guanosine levels, producing 8-OHdG. 8-OHdG levels were used as an index of oxidative DNA damage. Recently, 8-OHdG has been widely used in many studies not only as a biomarker for measuring endogenous oxidative DNA damage, but also as a risk factor for many diseases [48].

Previous studies have detected higher salivary 8-OHdG levels in periodontitis patients than in healthy controls [51] and also significant correlations between salivary 8-OHdG levels and periodontal parameters [20]. In other studies, higher serum 8-OHdG levels have been observed in patients with periodontitis and hyperlipidemia [52], or periodontitis and polycystic ovary syndrome [19] than in patients without periodontal disease associated with systemic pathology. In addition, a recent systematic review with meta-analysis identified increased levels of 8-OHdG in gingival crevicular fluid of periodontitis sites [53]. However, unlike this study, previous studies have not evaluated the urine 8-OHdG levels in patients with periodontitis. We did not observe significant differences in urine 8-OHdG levels between patients with different periodontitis stages. Likewise, we did not observe a significant correlation between urine 8-OHdG levels and periodontal clinical parameters. After DNA repair, 8-OHdG is excreted in the urine, and numerous studies have indicated that urinary 8-OHdG is an important cellular oxidative stress biomarker [48]. Therefore,

more studies on patients with periodontitis are required to evaluate systemic blood or urine oxidative stress markers to determine the impact of periodontal disease on the pathophysiology of systemic inflammatory diseases.

To the best of our knowledge, this is the first periodontal study to measure urine 8-OHdG levels to determine the effect of periodontitis on systemic pro-oxidant marker levels. We performed a full-mouth periodontal examination, measuring six sites per tooth for all teeth, thus obtaining more comprehensive data than studies using a partial mouth assessment. However, this study has some limitations. The sample size was small. Therefore, when dividing the sample by periodontitis stages, the groups could individually lose statistical power. MDA and 8-OHdG levels were evaluated only in serum and urine samples, respectively. The grade criterion was not used to classify the groups due to the small sample size and the cross-sectional nature of the study. Finally, the cross-sectional nature of this study limits its interpretability. Undoubtedly, there is still much to learn about the association between systemic proinflammatory and pro-oxidant markers and periodontitis and their relationship with systemic inflammatory disease risk. Further prospective studies should be conducted to further reveal the role of periodontitis on systemic levels of inflammatory and pro-oxidant markers and their respective consequences on general health.

5. Conclusions

The findings of this study support the concept that periodontitis, especially advanced periodontitis, increases systemic inflammation mediators' levels, which are atherosclerotic disease risk factors. We observed an increase in serum of hsCRP and fibrinogen levels as the severity of periodontitis increases. However, we did not find associations between periodontitis severity and MDA serum levels and 8-OHdG urine levels. This suggests the importance of early periodontal diagnosis and treatment to avoid possible future systemic complications due to the persistence of chronic inflammation. Periodontitis, as a local inflammatory disease, could cause an increase in inflammation and consequently in systemic oxidative stress and could be involved in the development or exacerbation of systemic inflammatory diseases, such as cardiovascular disease. Therefore, further prospective studies are needed to evaluate the systemic oxidative stress marker levels in patients with periodontitis to establish possible implications of periodontal disease in systemic inflammatory diseases.

Author Contributions: Conceptualization, S.S.-d.-R. and F.P.; data curation, R.A.; formal analysis, R.A.; investigation, R.A.; methodology, R.A.; project administration, S.S.-d.-R. and F.P.; resources, R.A.; software, R.A.; supervision, S.S.-d.-R. and F.P.; validation, S.S.-d.-R. and F.P.; visualization, S.S.-d.-R. and F.P.; writing—original draft, R.A.; writing—review and editing, S.S.-d.-R. and F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. The work was supported by the private Dental Clinic Andreu Dental, in Paterna, Spain.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee of the Arnau de Vilanova-Lliria (Valencia, Spain) hospital (protocol RAM-LIG-2019-01).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: These data will be treated in accordance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 of April 27 (GDPR) and Organic Law 3/2018 of April 5 December (LOPDGDD), for which the following treatment information is provided. Purposes of the treatment: -Participation of the interested party in the Study on the relationship between periodontal disease and serum levels of ultrasensitive hsCRP and Fibrinogen. -Statistical and/or scientific purposes. Data conservation criteria: they will be kept for no longer than necessary to maintain the end of the treatment and when it is no longer necessary for that purpose, they will be deleted with adequate security measures to guarantee the pseudonymization of the data or the total destruction of the same. Communication of the data: the data will not be communicated to third parties, except legal obligation. Rights that

assist the Interested Party: -Right to withdraw consent at any time. -Right of access, rectification, portability and deletion of your data and the limitation or opposition to its treatment. -Right to file a claim with the Control Authority (www.aepd.es) if you consider that the treatment does not comply with current regulations.

Acknowledgments: The authors acknowledge the assistance of Ivonne Herrero (Analclinc Laboratory).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dye, B.A. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology 2000* **2012**, *58*, 10–25. [[CrossRef](#)]
2. Carrion, J.; Scisci, E.; Miles, B.; Sabino, G.J.; Zeituni, A.E.; Gu, Y.; Bear, A.; Genco, C.; Brown, D.; Cutler, C. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 3178–3187. [[CrossRef](#)]
3. Kim, J.; Amar, S. Periodontal disease and systemic conditions: A bidirectional relationship. *Odontology* **2006**, *94*, 10–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cecoro, G.; Annunziata, M.; Iuorio, M.T.; Nastro, L.; Guida, L. Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review. *Medicina* **2020**, *56*, 272. [[CrossRef](#)]
5. Morley, J.J.; Kushner, I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1982**, *389*, 406–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 448–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dayer, E.; Dayer, J.M.; Roux-Lombard, P. Primer: The practical use of biological markers of rheumatic and systemic inflammatory diseases. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2007**, *3*, 512–520. [[CrossRef](#)]
8. Kanzaki, H.; Wada, S.; Narimiya, T.; Yamaguchi, Y.; Katsumata, Y.; Itohiya, K.; Fukaya, S.; Miyamoto, Y.; Nakamura, Y. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 351. [[CrossRef](#)]
9. DelRio, D.; Stewart, A.J.; Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2005**, *15*, 316–328. [[CrossRef](#)]
10. Niki, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 469–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ock, C.Y.; Kim, E.H.; Choi, D.J.; Lee, H.J.; Hahm, K.B.; Chung, M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 302–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, Y.; Andrukhov, O.; Rausch-Fan, X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Altıngöz, S.M.; Kurgan, Ş.; Önder, C.; Serdar, M.A.; Ünlütürk, U.; Uyanık, M.; Başkal, N.; Tatakis, D.N.; Günhan, M. Salivary and serum oxidative stress biomarkers and advanced glycation end products in periodontitis patients with or without diabetes: A cross-sectional study. *J. Periodontol.* **2020**. online ahead of print. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, M.; Cai, W.; Zhao, S.; Shi, L.; Chen, Y.; Li, X.; Sun, X.; Mao, Y.; He, B.; Hou, Y.; et al. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* **2019**, *46*, 608–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dinç, G.; Fentoğlu, Ö.; Doğru, A.; İlhan, I.; Kirzioğlu, F.Y.; Orhan, H. The evaluation of salivary oxidative stress in patients with familial Mediterranean fever and chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 1112–1120. [[CrossRef](#)]
16. Naresh, C.K.; Rao, S.M.; Shetty, P.R.; Ranganath, V.; Patil, A.S.; Anu, A.J. Salivary antioxidant enzymes and lipid peroxidation product malondialdehyde and sialic acid levels among smokers and non-smokers with chronic periodontitis—A clinico-biochemical study. *J. Family Med. Prim. Care* **2019**, *8*, 2960–2964. [[CrossRef](#)]
17. Lutfioğlu, M.; Aydoğdu, A.; Atabay, V.E.; Sakallioğlu, E.E.; Avci, B. Gingival crevicular fluid oxidative stress level in patients with periodontal disease and hyperlipidemia. *Braz. Oral. Res.* **2017**, *31*, e110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Isola, G.; Polizzi, A.; Santonocito, S.; Alibrandi, A.; Ferlito, S. Expression of salivary and serum malondialdehyde and lipid profile of patients with periodontitis and coronary heart disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6061. [[CrossRef](#)]
19. Sağlam, E.; Canakci, C.F.; Sebin, S.O.; Saruhan, N.; Ingeç, M.; Canakci, H.; Sezer, U. Evaluation of oxidative status in patients with chronic periodontitis and polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 76–84. [[CrossRef](#)]
20. Nguyen, T.T.; Ngo, L.Q.; Promsudthi, A.; Surarit, R. Salivary oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis and acute coronary syndrome. *Clin. Oral. Investig.* **2017**, *21*, 2345–2353. [[CrossRef](#)]
21. Sanz, M.; Marco Del Castillo, A.; Jepsen, S.; Gonzalez-Juanatey, J.R.; D’Aiuto, F.; Bouchard, P.; Chapple, I.; Dietrich, T.; Gotsman, I.; Graziani, F.; et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J. Clin. Periodontol.* **2020**, *47*, 268–288. [[CrossRef](#)]
22. Bullon, P.; Newman, H.N.; Battino, M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: A shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000* **2014**, *64*, 139–153. [[CrossRef](#)]
23. Tonetti, M.S.; Greenwell, H.; Kornman, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, S159–S172. [[CrossRef](#)]

24. Matthews, J.B.; Wright, H.J.; Roberts, A.; Cooper, P.R.; Chapple, I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *147*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sczepanik, F.S.C.; Grossi, M.L.; Casati, M.; Goldberg, M.; Glogauer, M.; Fine, N.; Tenenbaum, H.C. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontology 2000* **2020**, *84*, 45–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Buhlin, K.; Hultin, M.; Norderyd, O.; Persson, L.; Pockley, A.G.; Rabe, P.; Klinge, B.; Gustafsson, A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36*, 541–549. [[CrossRef](#)]
27. Elter, J.R.; Hinderliter, A.L.; Offenbacher, S.; Beck, J.D.; Caughey, M.; Brodala, N.; Madianos, P.N. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: A pilot trial. *Am. Heart J.* **2006**, *151*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gotsman, I.; Lotan, C.H.; Soskolne, W.A.; Rassovsky, S.; Pugatsch, T.; Lapidus, L.; Novikov, Y.; Masrawa, S.; Stabholz, A. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 849–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nakajima, T.; Honda, T.; Domon, H.; Okui, T.; Kajita, K.; Ito, H.; Takahashi, N.; Maekawa, T.; Tabeta, K.; Yamazaki, K. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J. Periodontol. Res.* **2010**, *45*, 116–122. [[CrossRef](#)]
30. Harley, S.L.; Sturge, J.; Powell, J.T. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 652–658. [[CrossRef](#)]
31. Varghese, J.; Bhat, V.; Chianeh, Y.R.; Kamath, V.; Al-Haj Husain, N.; Özcan, M. Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Odontology* **2020**, *108*, 569–577. [[CrossRef](#)]
32. Romandini, M.; Lafori, A.; Romandini, P.; Baima, G.; Cordaro, M. Periodontitis and platelet count: A new potential link with cardiovascular and other systemic inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1299–1310. [[CrossRef](#)]
33. Mattila, K.; Vesanen, M.; Valtonen, V.; Nieminen, M.; Palosuo, T.; Rasi, V.; Asikainen, S. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: A pilot study. *BMC Infect. Dis.* **2002**, *2*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ouyang, X.Y. Association between periodontal disease and coronary heart disease. *J. Peking Univ. Health Sci.* **2008**, *40*, 112–115.
35. Albush, M.M.; Razan, K.K.; Raed, A.D. Effect of surgical and non-surgical periodontal debridement on vascular thrombotic markers in hypertensives. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2013**, *17*, 324–329. [[CrossRef](#)]
36. Dikshit, S. Fibrinogen degradation products and periodontitis: Deciphering the connection. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, *9*, ZC10–ZC12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bokhari, S.A.; Khan, A.A. Growing burden of noncommunicable diseases: The contributory role of oral diseases, Eastern Mediterranean Region perspective. *East. Mediterr. Health J.* **2009**, *15*, 1011–1020. [[CrossRef](#)]
38. Vidal, F.; Figueredo, C.M.; Cordovil, I.; Fischer, R.G. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J. Periodontol.* **2009**, *80*, 786–791. [[CrossRef](#)]
39. Balamir, I.; Ates, I.; Topcuoglu, C.; Turhan, T. Association of Endocan, Ischemia-Modified Albumin, and hsCRP levels with endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Angiology* **2018**, *69*, 609–616. [[CrossRef](#)]
40. Ernst, E.; Koenig, W. Fibrinogen and cardiovascular risk. *Vasc. Med.* **1997**, *2*, 115–125. [[CrossRef](#)]
41. Schenkein, H.A.; Papapanou, P.N.; Genco, R.; Sanz, M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontology 2000* **2020**, *83*, 90–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Avdeev, A.; Boykiv, A.; Drevnitskaya, R. Changes in the indicators of lipid peroxidation and antioxidant system in the serum of the blood in animals with experimental periodontitis with changed reactivity. *Georgian. Med. News* **2019**, *287*, 124–127.
43. Kesarwala, A.H.; Krishna, M.C.; Mitchell, J.B. Oxidative stress in oral diseases. *Oral. Dis.* **2016**, *22*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Koregol, A.C.; Kalburgi, N.B.; Kannappa Sadasivan, S.; Warad, S.; Kamat Wagh, A.; Thomas, T.; Sinha, P. 8-isoprostane in chronic periodontitis and type II diabetes: Exploring the link. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospect.* **2018**, *12*, 252–257. [[CrossRef](#)]
45. Kadiiska, M.B.; Gladen, B.C.; Baird, D.D.; Germolec, D.; Graham, L.B.; Parker, C.E.; Nyska, A.; Wachsman, J.T.; Ames, B.S.; Basu, S.; et al. Biomarkers of oxidative stress study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 698–710. [[CrossRef](#)]
46. Kouda, K.; Nakamura, H.; Fan, W.; Horiuchi, K.; Takeuchi, H. The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine. *Clin. Biochem.* **2001**, *34*, 247–250. [[CrossRef](#)]
47. Liu, C.S.; Tsai, C.S.; Kuo, C.L.; Chen, H.W.; Lii, C.K.; Ma, Y.S.; Wei, Y.H. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic. Res.* **2003**, *37*, 1307–1317. [[CrossRef](#)]
48. Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.; Fiotakis, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2009**, *27*, 120–139. [[CrossRef](#)]
49. Baltacıoğlu, E.; Yuva, P.; Aydın, G.; Alver, A.; Kahraman, C.; Karabulut, E.; Akalın, F.A. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: A new biomarker for periodontal disease? *J. Periodontol.* **2014**, *85*, 1432–1441. [[CrossRef](#)]
50. Varadan, M.; Gopalkrishna, P.; Bhat, P.V.; Kamath, S.U.; Krithishree, S.; Thriveni, G.K.; Kumar, S. Influence of polycystic ovary syndrome on the periodontal health of Indian women visiting a secondary health care centre. *Clin. Oral. Investig.* **2019**, *23*, 3249–3255. [[CrossRef](#)]

51. Canakci, C.F.; Cicek, Y.; Yildirim, A.; Sezer, U.; Canakci, V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur. J. Dent.* **2009**, *3*, 100–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Fentoğlu, Ö.; Kırzioğlu, F.Y.; Bulut, M.T.; Kumbul Doğuç, D.K.; Kulaç, E.; Önder, C.; Günhan, M. Evaluation of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in patients with periodontitis and hyperlipidemia. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, 682–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Baima, G.; Corana, M.; Iaderosa, G.; Romano, F.; Citterio, F.; Meoni, G.; Tenori, L.; Aimetti, M. Metabolomics of gingival crevicular fluid to identify biomarkers for periodontitis: A systematic review with meta-analysis. *J. Periodontal. Res.* **2021**, *56*, 633–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

