



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PERIOSTIN Y ENFERMEDAD PERIODONTAL COMO
MODIFICADORES DE ENFERMEDAD CORONARIA POR
ATEROSCLEROSIS

DOCTORANDA:

GLORIA GONZÁLEZ PÉREZ

DIRECTORES DE TESIS:

PABLO ANTONIO GALINDO MORENO

MIGUEL PADIAL MOLINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA



PERIOSTIN Y ENFERMEDAD PERIODONTAL COMO
MODIFICADORES DE ENFERMEDAD CORONARIA POR
ATEROSCLEROSIS



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gloria González Pérez
ISBN: 978-84-1195-391-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/93116>





*“Las ideas no duran mucho,
hay que hacer algo con ellas”*

Santiago Ramón y Cajal.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



El trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis, titulada “**Periostin y enfermedad periodontal como modificadores de enfermedad coronaria por aterosclerosis**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por Doña Gloria González Pérez.

Una vez publicado el artículo anexo en revista del área y redactada la presente memoria, ha sido revisada y es adecuada para ser presentada y permitir a la doctoranda aspirar al grado de Doctora ante el Tribunal que se designe.

Garantizamos, además, que hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Pablo Galindo Moreno

Miguel Padial Molina

Catedrático de Cirugía Bucal e
Implantología

Profesor Titular de Cirugía Bucal e
Implantología





TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE ODONTOLOGIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEDICATORIA

A mis tres Álvaros

A mi madre

A mi abuela Isi

A Pablo

A mis 7 angelitos



TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE ODONTOLOGIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA

AGRADECIMIENTOS

Con constancia y esfuerzo, pero sobre todo con la ayuda necesaria se van cumpliendo objetivos. Por tanto, quiero en este momento agradecer a todas las personas que me han ayudado a lo largo de este camino.

Al Profesor Pablo Galindo Moreno, por sus conocimientos infinitos y su generosidad para compartirlos. Por haber confiado en mí y haberme dado tantísimas oportunidades que sin duda alguna me han hecho crecer como persona, pero sobre todo como profesional. Por permitirme un día estar a su lado y quedarme para siempre. Gracias, gracias y gracias.

Al Profesor Miguel Padial Molina, por dejarme hacer de lo suyo algo mío. Por su implicación constante y su paciencia infinitiva. Nunca podré agradecerte todo el tiempo que me has dedicado y el cariño con el que lo has hecho. Sin duda todo esto no hubiera sido posible sin ti.

A la Profesora Elena Sánchez Fernández, por ser otra fuente de inspiración. Gracias por acogerme con tanto cariño y por darme la oportunidad de formarme a tu lado.

Al Profesor Francisco O'Valle Ravassa, por su ejemplo de constancia y por su colaboración y orientación en el análisis de las muestras.

Al Profesor José Antonio Ramírez Hernández y al Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por su ayuda en el reclutamiento de pacientes.

A los miembros del Grupo de Investigación CTS-1028 "Biología Oral y Regeneración", especialmente a Darío Abril García, Ana Belén Castillo Gálvez, Natividad Martín Morales y Allinson Olaechea Torres.

A Paqui Castillo, por tener siempre tan buena disposición para ayudarnos en cada una de las visitas.

Al personal de las clínicas de la Facultad de Odontología.

Al Programa Andalucía Talent Hub de la Agencia Andaluza del Conocimiento, con financiación a través de las Acciones Marie Skłodowska-Curie (COFUND - Acuerdo nº 291780) del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea, por la financiación concedida para la realización de este proyecto.

A Lourdes Gutiérrez, compañera y además amiga. Gracias por hacer mis días en Granada más bonitos y por ser en lo profesional un espejo más en el que mirarme.

A mis amigas, por hacer de mis ratos libres momentos eternos y por tener una palabra de ánimo en el momento oportuno. En especial a Lucía, que desde hace casi treinta años ha estado a mi lado de manera incondicional.

Y por último, a mi familia.

A mis padres, por ser un ejemplo constante en cada uno de los aspectos de mi vida. Por insistir y animarme cuando las ganas flaqueaban y enseñarme desde bien pequeña que con esfuerzo las metas se consiguen y los sueños dejan de serlo. Todo os lo debo a vosotros.

A mi hermano, por su apoyo incondicional y su sonrisa permanente. Eres luz.

A Pablo, tenerte y compartir mi vida contigo es una suerte. Eres ejemplar en lo personal y también en lo profesional. Gracias por entenderme, cuidarme y quererme tan bien. Esto es un mérito más de lo que estamos consiguiendo juntos.

Y a mi pequeño Álvaro, cuya sonrisa me da fuerzas hasta en los días más difíciles.



ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	19
ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	25
RESUMEN	29
1. INTRODUCCIÓN	35
1.A. PERIODONTO	35
1.A.1. Tejidos duros.....	35
1.A.2. Tejidos blandos.....	36
1.B. ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	38
1.C. CONEXIONES SISTÉMICAS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	43
1.C.1. Mecanismos biológicos	48
1.D. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ATEROESCLEROSIS	49
1.D.1. Mecanismos biológicos que explican la relación periodontal- cardiovascular.....	52
1.E. PERIOSTIN.....	58
1.E.1. Periostin en ligamento periodontal.....	60
1.E.2. Periostin en el sistema cardiovascular.....	64
2. HIPÓTESIS.....	69
3. OBJETIVOS	73
4. METODOLOGÍA	77

4.A.	DISEÑO Y CONSIDERACIONES ÉTICAS	77
4.B.	CALIBRACIÓN Y ENTRENAMIENTO	78
4.C.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	79
4.D.	PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIO	81
4.E.	RECOGIDA DE DATOS Y MUESTRAS	82
4.E.1.	<i>Examen clínico</i>	83
4.E.2.	<i>Obtención de muestras</i>	85
4.E.3.	<i>Tratamiento y análisis de muestras</i>	86
4.F.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
5.	RESULTADOS	93
5.A.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	93
5.B.	ESTADO INICIAL Y EVOLUCIÓN CLÍNICA	96
5.C.	MARCADORES ANALIZADOS EN FLUIDO CREVICULAR Y EN SUERO	
	112	
5.C.1.	<i>Marcadores en fluido crevicular</i>	112
5.C.2.	<i>Marcadores en suero</i>	118
5.C.3.	<i>Correlaciones entre variables</i>	127
6.	DISCUSIÓN	131
7.	CONCLUSIONES	141
8.	BIBLIOGRAFÍA	145
9.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	165
9.A.	COMUNICACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS	165
9.B.	PUBLICACIÓN EN REVISTA INTERNACIONAL CON ÍNDICE DE IMPACTO	166
10.	ANEXOS.....	169
10.A.	APROBACIÓN ÉTICA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA	169



10.B.	APROBACIÓN ÉTICA POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE GRANADA.....	170
10.C.	HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	171
10.D.	PUBLICACIÓN CIENTÍFICA.....	179



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- AKT: enzima de tipo proteína serina-treonina cinasa
- BOP: sangrado al sondaje
- CAL: nivel de inserción clínica
- CEJ: unión amelocementaria
- CONSORT: normas consolidadas sobre el reporte de ensayos clínicos
- COX-2: prostaglandina-endoperoxidasa 2
- CRP: proteína C reactiva
- DE: desviación estándar
- ECV: enfermedades cardiovasculares
- ECVA: enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas
- ERK: señal extracelular regulada por kinasas
- FAK: cinasa de adhesión local
- FGM: margen gingival libre
- GCF: fluido crevicular gingival
- GM: margen gingival
- GR: recesión gingival
- HDL: lipoproteína de alta densidad (colesterol “bueno”)
- HSPs: proteínas de choque térmico
- IL: interleucina
- IFN- γ : interferón gamma
- IMC: índice de masa corporal
- KO (ratones): ratón modificado genéticamente
- LDL: lipoproteína de baja densidad (colesterol “malo”)
- MeSH: encabezamiento de materia médica

- MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1-alpha
- MMP: metaloproteinasas de matriz
- mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero
- f PAAP: proteínas de agregación plaquetaria
- PD: profundidad de sondaje
- PKB: proteína cinasa B
- POSTN: gen codificante de periostin
- PD: profundidad de sondaje
- RAR: raspado y alisado radicular
- SMAD: familia de proteínas de factores de transcripción
- SRC: familia de tirosinas kinasas no receptoras
- TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
- VEGFR1: receptor del factor de crecimiento endotelial-vascular
- WT (ratones): ratón sano

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la estructura del periodonto con detalle en los componentes fundamentales del ligamento periodontal.....	38
Figura 2: Representación gráfica de un periodonto sano (a la izquierda) y un periodonto enfermo (a la derecha).....	39
Figura 3: Diagrama resumen de los mecanismos biológicos de interacción entre la enfermedad periodontal y la aterogénesis.....	57
Figura 4: Representación esquemática de las vías de inducción de la producción de periostin y su función principal.	59
Figura 5: Diferentes tejidos en los que podemos encontrar periostin, fundamentalmente, y su alta especificidad por el ligamento periodontal (en rojo) en una imagen de inmunofluorescencia. Se observa de forma detallada la distribución siguiendo la estructura fibrilar del ligamento y específicamente de los haces de fibras de colágeno que se insertan en el hueso y en la dentina. ...	60
Figura 6: Imagen por microtomografía computarizada de las estructuras alveolares y dentarias en ratones normales (wild-type; WT) y knock-out para periostin. Se observa la integridad de la estructura del hueso alveolar en el primero de los casos en contraposición a la destrucción severa en el segundo.	61
Figura 7: Representación esquemática de la hipótesis de estudio.....	69
Figura 8: Secuencia de recogida de datos y muestras, así como indicación del objetivo al que se corresponden.	83
Figura 9: Diagrama CONSORT de los pacientes evaluados, incluidos y analizados.....	94

Figura 10: Nivel de inserción clínica como composición en gráfico de columnas apiladas del FGM (color más oscuro) y el PD (color más claro) a lo largo del tiempo en cada grupo de estudio.	98
Figura 11: Evolución temporal del nivel de inserción clínica. Como puede observarse, el cambio importante se produce entre el inicio y los 3 meses, pero no entre 3 y 6 meses, como por otra parte podría ser de esperar.	99
Figura 12: Evolución temporal de la profundidad de sondaje. Como puede observarse, el cambio importante se produce entre el inicio y los 3 meses, pero no entre 3 y 6 meses.	101
Figura 13: Evolución temporal de la posición del margen gingival. Como puede observarse, el cambio importante se produce sólo en el grupo de terapia quirúrgica, siendo la diferencia significativa sólo entre el inicio y los 6 meses.	102
Figura 14: Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje en cada grupo y tiempo de seguimiento.	103
Figura 15: Representación gráfica del índice de placa A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo al que se aplicó terapia no quirúrgica.	104
Figura 16: Representación gráfica del índice gingival A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo al que se aplicó terapia no quirúrgica.	105
Figura 17: Evolución del dolor medido en escala de 0 a 100.	106
Figura 18: Representación gráfica del índice de curación a lo largo de las 4 primeras semanas A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo de intervención no quirúrgica.	108
Figura 19: Representación gráfica de las presiones arteriales, tanto sistólicas como diastólicas, en ambos grupos a lo largo del tiempo.	109
Figura 20: Valores de glucemia a lo largo del tiempo en los grupos de estudio.	111

Figura 21: Niveles de CRP en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	113
Figura 22: Niveles de IFN- γ en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	113
Figura 23: Niveles de IL-1 β en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	114
Figura 24: Niveles de IL-10 en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	114
Figura 25: Niveles de MIP-1 α en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	115
Figura 26: Niveles de periostin en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	115
Figura 27: Niveles de TNF- α en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	116
Figura 28: Niveles de CRP en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	119
Figura 29: Niveles de fibrinógeno en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	120

Figura 30: Niveles de IFN- γ en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	120
Figura 31: Niveles de IL-1 β en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	121
Figura 32: Niveles de IL-6 en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	121
Figura 33: Niveles de IL-10 en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	122
Figura 34: Niveles de L-selectina en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	122
Figura 35: Niveles de MIP-1 α en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	123
Figura 36: Niveles de periostin en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).	123
Figura 37: Niveles de TNF- α en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	124
Figura 38: Niveles de factor de von Willebrand en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).....	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción ilustrativa de los procedimientos a realizar en cada visita y su temporización.	82
Tabla 2: Resumen de las principales características de los marcadores analizados en el estudio.....	88
Tabla 3: Resumen de variables demográficas al inicio del estudio.....	94
Tabla 4: Resumen de datos y comparación estadística de los datos clínicos periodontales.....	96
Tabla 5: Pain measured in a 0-100 mm scale combined or by group and time point.	106
Tabla 6: Wound Healing Index (n (%)) combined or by group and time point.	108
Tabla 7: Blood pressure (mm Hg) over time. Data is shown as mean (SD).....	109
Tabla 8: Glycemia (mg/dl) over time. Data is shown as mean (SD).	111
Tabla 9: Markers in gingival crevicular fluid, listed alphabetically. All values represent mean (SD). Units are specified for each molecule.	116
Tabla 10: Markers in serum, listed alphabetically. All values represent mean (SD). Units are specified for each molecule.	125



RESUMEN



RESUMEN

Introducción: La enfermedad periodontal consiste en una respuesta inflamatoria que destruye el tejido de soporte de los dientes. Se ha relacionado con diversos procesos patológicos sistémicos. Entre ellos, una de las asociaciones más estudiadas es la que relaciona la enfermedad periodontal y las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (ACVD). Las ACVD ocurren por la formación de placas de ateroma en la pared arterial que disminuyen e incluso interrumpen el flujo vascular, con consecuencias graves cuando ocurren en arterias coronarias, cerebrales o periféricas. Se han descrito diversos mecanismos para explicar la interacción entre ambas, si bien, dada la dificultad y la condición multifactorial de las dos enfermedades, se siguen proponiendo y analizando nuevas vías. Así, el presente estudio propone la evaluación de la asociación a través de la molécula periostin. Periostin es altamente relevante en ambos sistemas, el periodontal y el cardiovascular. Por un lado, periostin es fundamental para el mantenimiento de los tejidos de soporte del diente, concretamente el ligamento periodontal, al estar implicado en el proceso de fibrillogénesis del colágeno, del cual el ligamento es especialmente rico. Sin embargo, también se ha detectado en placas de ateroma y se encuentra elevado en pacientes en riesgo de sufrir nuevos eventos cardiovasculares por este motivo. De hecho, se ha descrito un papel multifuncional de periostin dependiendo del tejido en el que se exprese, así como la temporalidad. Por tanto, el presente estudio plantea la hipótesis de que un control de la enfermedad periodontal puede contribuir a la reducción de los niveles circulantes de periostin, lo que disminuiría así el riesgo cardiovascular.

Objetivos: El objetivo global de la presente Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto del tratamiento de la enfermedad periodontal en la enfermedad aterosclerótica coronaria a través de los niveles circulantes de periostin, proponiendo concretamente, evaluar los niveles basales de periostin en suero y fluido crevicular en pacientes con aterosclerosis coronaria y enfermedad periodontal concomitante, analizar las variaciones de periostin en suero y fluido crevicular a lo largo del tiempo en pacientes con aterosclerosis coronaria tras recibir tratamiento para la enfermedad periodontal y evaluar el impacto de la cirugía periodontal en las concentraciones de distintos marcadores de periodontitis y aterosclerosis, observando su variación a lo largo del tiempo y comparándolos con los del tratamiento no quirúrgico.

Material y métodos: Para la consecución de los objetivos fijados se diseñó un estudio clínico aleatorizado en pacientes con enfermedad periodontal y aterosclerosis coronaria concomitante. Se incluyeron pacientes con periodontitis severa que requiriesen tratamiento quirúrgico y que, además, hubiesen sufrido un evento cardíaco en los 6-36 meses anteriores o hubiesen sido diagnósticos de bloqueo de alguna arteria coronaria por encima del 50%. Los pacientes fueron tratados mediante terapia quirúrgica periodontal (colgajo modificado de Widman o de acceso en el cuadrante en peor estado) o terapia no quirúrgica (raspado y alisado radicular completo). En todos estos pacientes se midieron diversos parámetros clínicos, incluyendo un periodontograma completo, y valores bioquímicos a distintos tiempos, tanto en suero como en fluido crevicular, incluyendo periostin, CRP, fibrinógeno, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, MIP-1 α , L-selectina, TNF- α y factor de von Willebrand.

Resultados: Los resultados principales del presente estudio mostraron un aumento significativo y transitorio en los niveles locales de periostin en el fluido crevicular. Concretamente, estos niveles aumentan a los 7 días y hasta 4 semanas después del tratamiento quirúrgico de la enfermedad periodontal, no existiendo cambios en el grupo en el que se realizó terapia no quirúrgica. Además, de esto pudimos observar una reducción de algunos marcadores asociados con la enfermedad periodontal y aterosclerótica, incluyendo IL-6, MIP-1 α y TNF- α , particularmente en el grupo que recibió cirugía periodontal. Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas.

Conclusiones: En el presente estudio, no se ha podido demostrar un efecto del tratamiento de la enfermedad periodontal en la enfermedad aterosclerótica coronaria a través de los niveles circulantes de periostin. Debe considerarse, eso sí, el limitado tamaño muestral y el carácter piloto del presente estudio clínico. Aun así, a pesar de las limitaciones, el presente estudio ha realizado una aproximación válida y metodológicamente rigurosa al estudio de la plausibilidad biológica de la interacción entre las enfermedades periodontales y cardiovasculares por aterosclerosis a través de periostin. Nuestros resultados ofrecen oportunidades para futuros estudios con objeto de conseguir una visión más profunda y detallada del problema.



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.A. PERIODONTO

El periodonto es un conjunto de órganos compuestos por tejidos duros (cemento y hueso) y blandos (ligamento periodontal y encía) que tiene como función mantener de forma adecuada las estructuras dentarias uniéndolas al tejido óseo de los maxilares, así como mantener la integridad de la mucosa en la cavidad oral. El desarrollo de los tejidos periodontales se produce durante la formación y desarrollo de los dientes en la fase embrionaria. Así, cada uno de los componentes del periodonto influye en las actividades de las células adyacentes, aunque cada uno tiene una arquitectura tisular única y una composición bioquímica característica, que de forma resumida se presentarán a continuación (Lindhe et al. 2022).

1.A.1. Tejidos duros

1.A.1.1. *Cemento*

Es un tejido mineralizado especializado que cubre las superficies radiculares de los dientes y que no presenta inervación ni irrigación. En él se insertan las fibras del ligamento periodontal y una de sus funciones principales es contribuir al proceso de reparación cuando la superficie radicular del diente ha sido dañada.

Se caracteriza por no tener reabsorción ni remodelado, sino que es el resultado de un proceso de depósito continuo durante toda la vida.

1.A.1.2. Hueso alveolar

Es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y mantiene los alveolos de los dientes, dónde éstos quedan alojados. Está formado tanto por células del folículo o saco dentario como por células que son independientes del desarrollo dentario.

Las paredes de los alveolos están revestidas por hueso cortical y el área entre los alveolos y las paredes compactas del maxilar están formadas por hueso esponjoso. El hueso esponjoso ocupa la mayor parte de los tabiques interdenciales, pero solo una parte pequeña de las tablas vestibulares y palatinas.

1.A.2. Tejidos blandos

1.A.2.1. Encía

Es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Está formada por una capa epitelial y un tejido conjuntivo subyacente denominado lámina propia.

Se pueden distinguir dos tipos de encía diferentes:

- La encía libre que es color rosado con consistencia firme y comprende el tejido de los bordes gingivales dentarios hasta la unión amelo-cementaria y las papilas interdenciales.

La encía libre no se encuentra directamente adherida al diente en toda su extensión apico-coronal sino que conforma el surco gingival que en estado de salud no tiene una profundidad superior a 3 mm. Histológicamente en la encía libre podemos distinguir tres zonas epiteliales distintas, que son el epitelio bucal, el epitelio del surco y el epitelio de unión.

- La encía adherida se extiende desde el surco gingival hasta la línea mucogingival y presenta una consistencia firme y un color rosa pálido.

La encía adherida se une al hueso alveolar y al cemento subyacente por medio de fibras de tejido conectivo, denominadas fibras gingivo-dentarias.

1.A.2.2. *Ligamento periodontal*

El ligamento periodontal es un tejido predominantemente fibroso con una tasa de recambio muy alta (Bartold et al. 2000; Lindhe et al. 2022), cuya función principal es la fijación del diente al hueso, conectando el cemento radicular con la pared del alveolo, por lo que se encuentra ubicado entre las raíces dentales y el propio hueso alveolar. En el espacio periodontal, además de fibras de colágeno, se albergan también células de soporte, principalmente fibroblastos, y vasos sanguíneos. En la actividad y mantenimiento del conjunto, los fibroblastos del ligamento juegan un papel fundamental ya que presentan cierta capacidad de desdiferenciación, además de ser susceptibles a la acción de diversos mediadores y factores de crecimiento que regulan su función (**Figura 1**).

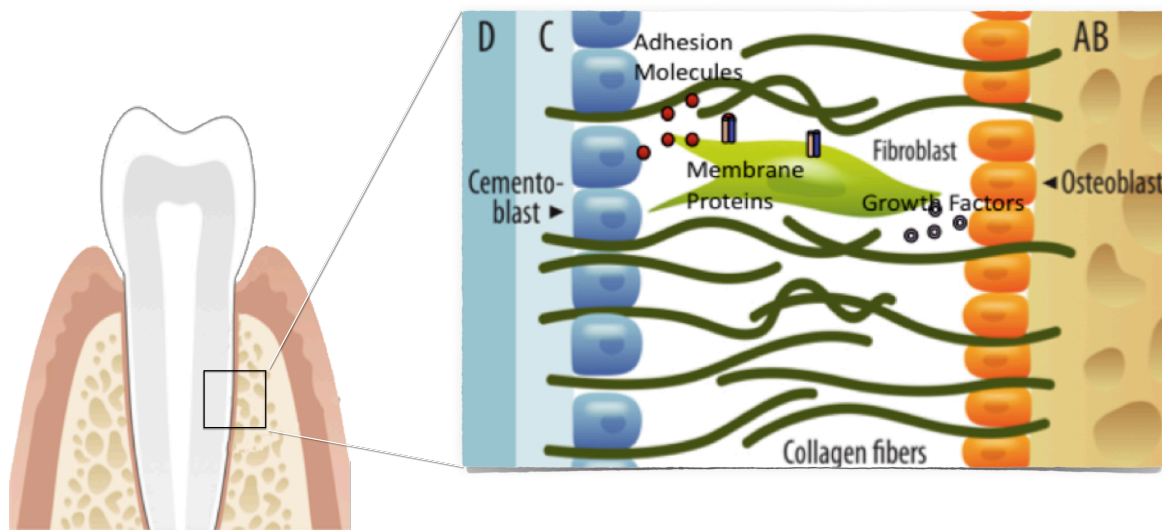


Figura 1: Representación esquemática de la estructura del periodonto con detalle en los componentes fundamentales del ligamento periodontal.

El espacio periodontal tiene un espesor, en circunstancias normales de salud, de entre 0,2 mm y 0,4 mm, dependiendo de la zona, siendo más ancho en el tercio medio radicular. La presencia del ligamento periodontal permite que las fuerzas masticatorias sean distribuidas y absorbidas por el hueso alveolar. Además, la presencia del ligamento permite la erupción de los dientes y su movimiento.

1.B. ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla en el periodonto (Page and Kornman 1997) y que está presente en alrededor de un 30-50% de la población adulta. Está distribuida en periodontitis leve alrededor de un 10%, moderada alrededor de un 30% y grave en torno al 10% (Eke et al. 2012).

Además, es considerada la sexta enfermedad humana más frecuente en la población mundial. La prevalencia mundial de la enfermedad se ha mantenido

estable en los últimos 30 años (Kassebaum et al. 2017). En España, la prevalencia de enfermedad periodontal es del 38,4% en mayores de 45 años, con un 13,7% de la población con pérdidas de inserción clínica de 4-5mm y un 7,7% con pérdidas de más de 6 mm (Carasol et al. 2016).

Debido a sus consecuencias respecto a la pérdida de soporte del diente, se considera la principal causa de pérdida de dientes y reabsorción ósea (Sheiham and Netuveli 2002) (**Figura 2**).

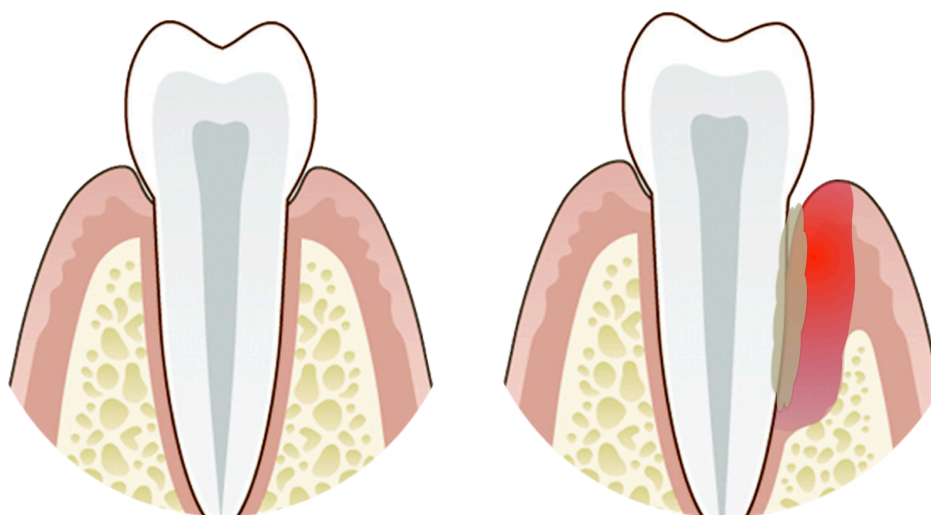


Figura 2: Representación gráfica de un periodonto sano (a la izquierda) y un periodonto enfermo (a la derecha).

Diversos factores influyen en el desarrollo de las enfermedades periodontales. Por un lado, la respuesta inflamatoria del hospedador hacia los patógenos es diferente en función de variaciones genéticas. Por otro lado, factores ambientales como la dieta, el tabaquismo o el estrés, así como factores demográficos, pueden afectar a la aparición de la enfermedad (Schenkein and Loos 2013; Hasturk and Kantarci 2015).

El origen de la enfermedad periodontal se encuentra en el desarrollo de infecciones bacterianas en el surco periodontal, que se producen probablemente debido a la disbiosis de poblaciones bacterianas propias del organismo en lugar de tratarse de una colonización por bacterias exógenas. Como consecuencia, con el objetivo de neutralizar la infección, el organismo desarrolla una respuesta inflamatoria con liberación de citoquinas, eicosanoides y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Esta secuencia de hechos, infección - inflamación, está siendo actualmente discutida en la literatura, argumentándose que quizás la colonización bacteriana sea consecuencia del desajuste en los tejidos del huésped y no al contrario.

En cualquier caso, encontramos, clásicamente, dos entidades diferenciadas de la enfermedad periodontal en base a la evolución y la gravedad de las lesiones. El proceso suele comenzar con la inflamación de las encías y tejidos de soporte evidenciada por sangrado al sondaje, pero sin pérdida de hueso alveolar, enfermedad que se engloba en la definición de gingivitis (Chapple et al. 2018). La periodontitis, sin embargo, cursa con la formación de bolsas periodontales entre el diente y la encía de más de 4 mm de profundidad, la destrucción de los tejidos periodontales, que se evidencia radiográficamente con la pérdida del soporte óseo y clínicamente con la migración apical de la inserción gingival (Chapple et al. 2018).

Otros parámetros, como la presencia de pérdida de dientes debido a la enfermedad, así como la extensión nos informarán de la complejidad tanto del caso como de su manejo clínico.

Un paciente con gingivitis puede volver a un estado de salud de forma totalmente íntegra. Por el contrario, un paciente con periodontitis o que la ha sufrido en el pasado mantendrá las consecuencias de la destrucción del tejido de soporte, incluso después de una terapia exitosa, lo que refleja diferencias en la etiopatogenia y los factores de riesgo asociados con el inicio y, sobre todo, progresión de la periodontitis. La periodontitis es, por tanto, una enfermedad inflamatoria crónica.

Los pacientes con periodontitis suelen ser asintomáticos con signos y síntomas altamente inespecíficos: inflamación, enrojecimiento y sangrado de las encías, pérdida de dientes, sensación de mal sabor de boca, halitosis, etc. Por ello, en ocasiones, el diagnóstico se realiza cuando el caso se encuentra avanzado. El diagnóstico se realiza mediante evaluación clínica y radiográfica para demostrar la presencia de inflamación y sangrado gingival, así como la pérdida de soporte óseo. En algunos casos, estos datos clínicos pueden complementarse con datos de evaluación microbiológica y la elevación de marcadores inflamatorios en saliva o fluido crevicular (GCF), como proteína C reactiva (CRP) o IL-1, que además orientan sobre el riesgo y el pronóstico de la periodontitis (Kinney et al. 2011; Kinney et al. 2014).

La enfermedad periodontal está considerada como una enfermedad multifactorial. En ella intervienen microorganismos y un huésped susceptible. Según las teorías aceptadas actualmente, los microorganismos actúan como factor etiológico esencial e iniciador del proceso infeccioso, pero la susceptibilidad o resistencia del hospedador a padecer la enfermedad está determinada por múltiples factores biológicos y genéticos, así como factores

sistémicos o de estilo de vida, que en definitiva serán los que permitan o no el desarrollo de la enfermedad (Page and Kornman 1997).

A modo de resumen, los factores de influencia principal en la enfermedad periodontal son:

- Factor microbiano. A pesar de que la flora subgingival es muy compleja, debido a las más de 700 especies bacterianas identificadas, existen tres microorganismos especialmente estudiados en la patogénesis de la periodontitis: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos participan en el proceso destructivo de las enfermedades periodontales por mecanismos diversos, entre los que se han propuesto sus capacidades de evasión de las defensas del huésped, invasión de los tejidos periodontales y elaboración de enzimas destructoras de los tejidos. Además, concretamente *P. gingivalis*, entre otras, es capaz de comportarse como una bacteria clave, coordinando el comportamiento de otras bacterias denominadas patobiontes, es decir, organismos nativos que se vuelven patógenos como consecuencia de asociaciones con otros microorganismos o cambios ambientales como modificaciones en el comportamiento del huésped (Hajishengallis 2014a; Hajishengallis 2014b; Hajishengallis and Lamont 2014).
- Factores biológicos o genéticos. Unas determinadas características genéticas pueden aumentar la susceptibilidad a la enfermedad periodontal. El carácter hereditario de la periodontitis está siendo muy estudiado en los últimos años. Según se estableció ya desde el inicio de esta caracterización, el desarrollo no parece depender de un único gen sino de la acción combinada de varios y en función de cuáles se encuentren afectados, de los

polimorfismos que tengan y de la población a la que pertenezca el individuo se padecerá un tipo de periodontitis u otra (Schenkein et al. 2020).

En cualquier caso, estos cambios o asociaciones entre alteraciones genéticas y susceptibilidad a la enfermedad periodontal podrían agruparse, fundamentalmente, en: alteraciones del sistema inmune, alteraciones de la respuesta inflamatoria, o alteraciones del colágeno.

- Factores de comportamiento o estilo de vida, fundamentalmente el tabaquismo y el alcohol, pero también el estrés. La exposición al estrés psicológico puede afectar a la respuesta inmunitaria del huésped, así como fomentar comportamientos poco saludables desde el punto de vista del cuidado periodontal (higiene deficiente, aumento de tabaquismo, menos visitas al dentista, etc.) (Genco et al. 1999; Peruzzo et al. 2007).
- Factores sistémicos. Existe un gran grupo de condiciones sistémicas que pueden afectar de forma colateral a la estabilidad del aparato de inserción del diente. La relación con estas condiciones es, generalmente, bidireccional, en la que una afecta a la otra. En cualquier caso, se trata, probablemente, en ambos casos, de manifestaciones en sitios distintos de unas mismas condiciones alteradas.

1.C. CONEXIONES SISTÉMICAS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Las conexiones entre la enfermedad periodontal y distintas condiciones sistémicas son el motivo de multitud de estudios y análisis, en ocasiones poco o mal ponderadas, pero absolutamente establecidas en otras.

Clásicamente, William Hunter ya expuso que “los peores casos de anemia, gastritis, colitis, fiebres, alteraciones nerviosas de todo tipo, desde depresión a otras lesiones, infecciones reumáticas crónicas y enfermedades renales eran aquellos que se originaban o estaban gravemente complicadas por sepsis oral” (Hunter 1900). En los últimos años se han realizado importantes avances en tres áreas que ayudan a entender el porqué de estas conexiones. La primera es la comprensión de la etiopatogenia de la periodontitis, la segunda es la identificación de los factores relevantes que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades periodontales y la tercera son las asociaciones epidemiológicas entre la periodontitis y las enfermedades sistémicas, así como los mecanismos que explican estas asociaciones debido a la importancia que tienen para la salud pública.

Debemos mencionar en primer lugar el término acuñado por Steven Offenbacher, medicina periodontal, durante sus estudios pioneros en la evaluación de la relación entre enfermedad periodontal y recién nacidos de bajo peso (Offenbacher et al. 1996).

Diversos estudios afirman que la periodontitis debido a la carga bacteriana da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado, que probablemente sea la responsable de la relación de ésta con las enfermedades sistémicas. Así, se han establecido relaciones entre la periodontitis y enfermedades sistémicas como la diabetes, la obesidad, la artritis reumatoide, ciertos tipos de cáncer, enfermedades de la piel como la psoriasis, enfermedades respiratorias o algunos trastornos cognitivos como la enfermedad de Alzheimer. De hecho, un análisis de registros de estudios clínicos en periodoncia concluye que hasta un tercio de la investigación en periodoncia se podría englobar en el campo de la medicina

periodontal. Este estudio de registros clínicos sobre asociaciones entre enfermedad periodontal y enfermedades sistémicas demostró que la gran mayoría de estudios se centran en evaluar las enfermedades cardiovasculares, así como alteraciones metabólicas, fundamentalmente la diabetes mellitus. Por magnitud, le siguen las enfermedades musculoesqueléticas, del tracto respiratorio, urogenitales de la mujer y complicaciones del embarazo, urogenitales del hombre y otras con una magnitud de estudios bastante más limitada. Por distribución temporal, el citado estudio concluye que en años más recientes se ha producido una mayor diversificación de las patologías asociadas, si bien la diabetes, inflamación sistémica, complicaciones del embarazo y enfermedades cardiovasculares han estado siempre presentes. Por último, este interesante estudio afirma que hasta casi un 2% de todos los términos MeSH de las subcategorías "Disease" y "Phenomena and Processes" se han asociado con la enfermedad periodontal (Monsarrat et al. 2016).

Dejando aparte la asociación con las enfermedades cardiovasculares, que trataremos en detalle más adelante, se presentan resumidamente algunas de las más estudiadas:

- Diabetes mellitus. Los pacientes con diabetes mellitus presentan 2 o 3 veces más periodontitis que aquellos con niveles de glucosa normales y la tasa de pérdida de dientes es mayor en aquellos pacientes diabéticos con mal control glucémico en comparación con los que presentan un buen control glucémico (Genco and Borgnakke 2020). Esto es así porque el estado de hiperglucemia fomenta la producción de niveles altos de productos finales de glicación en los tejidos periodontales, induciendo un estado hiperinflamatorio.

Otros de los posibles mecanismos se fundamentan en que la diabetes influye en el microbioma oral, induciendo el estado disbiótico del biofilm subgingival (Silva et al. 2022). También influyen las alteraciones presentes en la diabetes como son la microangiopatía, alteraciones en el flujo del fluido crevicular, modificaciones en el metabolismo del colágeno y respuesta inflamatoria alterada y predisposición genética (Taylor et al. 2021).

En sentido inverso, los pacientes diabéticos y con periodontitis experimentan además complicaciones diabéticas más graves y presentan una mayor tasa de mortalidad (Genco and Borgnakke 2020).

- Resultados adversos en el embarazo. Se relaciona sobre todo con bajo peso al nacer, parto prematuro y preeclampsia. La infección local que genera la enfermedad periodontal desencadena una reacción inflamatoria directa y los mediadores inflamatorios producidos localmente en los tejidos periodontales vertidos a la circulación sistémica alcanzan la unidad feto placentaria desencadenando estas alteraciones en el proceso del embarazo (Bobetsis et al. 2020). Particularmente, se ha detectado una correlación entre la presencia de periodontitis y niveles placentarios elevados de marcadores inflamatorios como la COX-2 y VEGFR1 en madres de niños de bajo peso con enfermedad periodontal (Pozo et al. 2016).
- Otras asociaciones. Existen otra multitud de asociaciones, quizás menos estudiadas, pero no por ello menos relevantes:
 - *Síndrome metabólico y obesidad*, explicada por un efecto sinérgico de comorbilidad en la inflamación sistémica que provoca una desregulación metabólica (Jepsen et al. 2020).
 - *Artritis reumatoide*, asociación debida a la citrulinación provocada por la *P. gingivalis* y la activación de la peptidil arginina deiminasa en el periodonto de pacientes con periodontitis y artritis (Bartold and Lopez-Oliva 2020).

- *Cáncer*, por el papel de varios patógenos periodontales como *P. gingivalis* o *Fusobacterium nucleatum*, entre otros, con posibles oncogenes relacionados, principalmente, con los del tracto digestivo y de cabeza y cuello (Nwizu et al. 2020).
- *Enfermedades de la piel*, como la psoriasis, que es una enfermedad inflamatoria crónica, de causa desconocida, con gran variabilidad clínica y evolutiva, ocasionada por una multiplicación demasiado rápida de las células de la piel. Al igual que ocurre con la periodontitis, el desarrollo y progresión de las lesiones dependen de factores inmunológicos, genéticos y ambientales. Los pacientes con enfermedad periodontal presentan un riesgo doble de sufrir psoriasis y se ha estudiado que casi un tercio de los pacientes con psoriasis padecían periodontitis de diversa gravedad relacionándose especialmente con una progresión avanzada (Nijakowski et al. 2022).
- *Enfermedades respiratorias*. Neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y asma se han relacionado con la enfermedad periodontal. La proximidad y la continuidad de la cavidad oral y el tracto respiratorio hacen que haya una flora compartida entre la cavidad oral y el pulmón que puede influir en la asociación de ambas enfermedades (Mammen et al. 2020).
- *Trastornos cognitivos*. Son muchos los estudios que ya asocian enfermedad periodontal con trastornos cognitivos, entre los que destaca el Alzheimer. Esta asociación se explica a través de una hipótesis inflamatoria, en la que una exposición prolongada a una inflamación sistémica junto con factores genéticos puede influir en un estado crónico de neuroinflamación. Además, patógenos orales pueden atravesar la barrera hematoencefálica y provocar cambios inflamatorios directos en el cerebro (Kamer et al. 2020). Sin embargo,

estas hipótesis se están viendo también modificadas por otras en las que se exponen otras conexiones entre la consecuencia de la enfermedad periodontal, que es la pérdida de dientes, y alteraciones en los patrones musculares, propioceptivos y de estabilidad y estimulación directa de áreas comunes a la masticación y a funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje (Lopez-Chaichio et al. 2021).

1.C.1. Mecanismos biológicos

Originalmente, se atribuía la conexión entre enfermedad periodontal y alteraciones sistémicas basándose en la teoría de la infección focal, según la cual una infección local que afecta a un área pequeña del organismo puede dar lugar a infecciones o síntomas en otras partes del cuerpo por la difusión del agente infeccioso o las toxinas que produce (Stillman and McCall 1922). Esta afirmación gana, además, más relevancia si tenemos en cuenta, como presentaron Socransky y Haffajee (Socransky and Haffajee 2002), que una bolsa periodontal podía albergar hasta 300 millones de microorganismos. Estos microorganismos serían los responsables directos de inducir lesiones purulentas, por contigüidad, ser aspirados, pasar al torrente sanguíneo y actuar a distancia (bacteriemia) o bien sólo transmitir sus factores de virulencia y toxinas (endotoxemia), que en conjunto podrían modular también la respuesta del huésped, no sólo localmente sino también a distancia (Kamer et al. 2008). En este caso, podríamos hablar de una conexión periodontal-sistémica siendo la enfermedad periodontal, además de un foco infeccioso, también un foco de inflamación sistémica de bajo grado. De forma también ilustrativa, se afirmó que “el área total de bolsas periodontales con inflamación activa en un sujeto con periodontitis moderada o severa estaría

en el rango de los 8 a 20 cm²", lo que equivaldría, aproximadamente, al área de la palma de la mano (Hujoel et al. 2001). En cualquier caso, en la actualidad se apunta más a una explicación combinada y bidireccional.

1.D. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ATEROESCLEROSIS

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos que afectan al sistema cardiovascular (corazón y vasos sanguíneos) (Libby et al. 2013). Se estima que en Europa las ECV son responsables de un 45% de las muertes totales (alrededor de 2.000.000 de personas al año) y que afectan a 1 de cada 3 personas, siendo, en su conjunto, la principal causa de muerte en todo el mundo, ya que equivale a un 30% de todas las muertes, esto es, alrededor de 17,3 millones de muertes (Wilkins et al. 2017); en España suponen también alrededor del 30% de todas las muertes. Además, se calcula que las ECV cuestan a la economía de la UE casi 110.000 millones de euros al año, al tratarse de una de las principales causas de enfermedad de larga duración, baja laboral y pérdida de empleo.

Entre las enfermedades cardiovasculares podemos distinguir dos grupos principales:

- Debidas a aterosclerosis y/o trombosis:
 - Cardiopatía coronaria, que puede resultar en infarto de miocardio.
 - Enfermedad cerebrovascular, que puede desencadenar una apoplejía.

- Enfermedad cardiovascular periférica.
- Hipertensión arterial.
- Otras enfermedades cardiovasculares:
 - Cardiopatía congénita.
 - Cardiopatía reumática.
 - Miocardiopatías.
 - Arritmias cardíacas.

De todas ellas, el 95% de las enfermedades cardiovasculares pertenecen al primer grupo (Roth et al. 2020). Las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (ECVA) son enfermedades inflamatorias que afectan fundamentalmente a arterias grandes y medias (Libby et al. 2013). Ocurren por una alteración del endotelio vascular y una acumulación progresiva de productos lipídicos (principalmente colesterol LDL) y células inflamatorias en la pared arterial en forma de placa de ateroma envuelta en una cápsula fibrosa (Han and Boisvert 2015; Hasturk and Kantarci 2015; Aarabi et al. 2017) que hace que el tamaño de la luz vascular se vea disminuido de forma progresiva hasta llegar incluso a ser interrumpido, lo que tiene graves consecuencias en arterias coronarias, cerebrovasculares y periféricas. De igual modo, las placas de ateroma pueden romperse y dar lugar a la formación de un trombo, que, en caso de alcanzar alguna arteria coronaria, puede bloquear el paso de la sangre y desembocar en un síndrome coronario agudo (Hansson 2005) como el infarto de miocardio, la angina inestable o la muerte súbita (Kanwar et al. 2016).

Aunque se trata de una enfermedad multifactorial y entre los factores de riesgo más conocidos se encuentran la obesidad, la diabetes, el tabaquismo y la hiperlipidemia (Larsen et al. 2015), la enfermedad periodontal ha venido

demostrándose como un factor asociado de especial relevancia, no sólo por las implicaciones biológicas propias sino también por el hecho de ser un factor cuya prevención y tratamiento es relativamente sencilla y económicamente asequible en comparación con el tratamiento de las consecuencias del problema cardiovascular.

Estudios clásicos a partir de encuestas de salud observaron ya en 1995 que pacientes con enfermedad periodontal y pobre higiene oral tenían 1,7 veces más riesgo de desarrollar enfermedad coronaria y 2,6 de morir por enfermedad cardiovascular que los pacientes sin periodontitis (Loesche et al. 1998). Posteriormente, otro estudio analítico demostró en 1996 una asociación con gradiente, es decir, que, al aumentar la severidad de la periodontitis, aumentó la probabilidad de infarto de miocardio (Beck et al. 1996). Además, estudios más recientes, parecen demostrar también una asociación independiente a través del aumento de la presión sanguínea, que en último término podría añadir otro factor de riesgo añadido (Muñoz Aguilera et al. 2021). Como consecuencia, la extensión y la severidad de la periodontitis da lugar a un aumento del tamaño del infarto y la severidad, según los niveles de troponina I y mioglobina (Marfil-Alvarez et al. 2014), entre otros. Pero no solo así. Estudios intervencionales y revisiones sistemáticas que también podríamos considerar clásicos, como los liderados por Tonetti, Offenbacher, Sanz, D'Aiuto o Teeuw, entre otros, vinieron a confirmar que, además de la asociación epidemiológica, había un mecanismo biológico que la explicaba y una serie de consecuencias positivas con el tratamiento de la enfermedad periodontal, como son la mejora del flujo y dilatación arterial (Tonetti et al. 2007), la mejora en los niveles de marcadores de enfermedad cardiovascular como lípidos, CRP y función endotelial (D'Aiuto et al. 2013), además de otros marcadores relevantes como TNF- α , fibrinógeno, colesterol

total y HDL, siendo el tratamiento incluso más beneficioso en paciente con comorbilidades (Teeuw et al. 2014).

1.D.1.Mecanismos biológicos que explican la relación periodontal-cardiovascular

Una vez aclarada la asociación estadística en estudios observacionales y también en estudios de intervención, cabe plantearse cuál es el mecanismo biológico que explica la relación entre ambas patologías, profundizando más allá de los descritos genéricos para otras relaciones.

En el caso de la relación entre enfermedad periodontal y cardiovascular de origen aterosclerótico, podemos describir cuatro principales. A grandes rasgos, estos mecanismos fueron originalmente propuesto por Gibson en 2006 para explicar las distintas capacidades de *P. gingivalis* para participar en la interacción (Gibson et al. 2006). Aspectos muy similares han sido posteriormente ampliados y discutidos por otros autores, quedando profusamente expuestos en trabajos de revisión como los de Schenkein y Loss (Schenkein and Loos 2013), el *Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases* (Tonetti et al. 2013), así como los de Reyes (Reyes et al. 2013) o Herrera y colaboradores (Herrera et al. 2020; Herrera et al. 2023):

1. Microorganismos del surco periodontal enfermo que pasan a sangre. Bacteriemia.
2. Inflamación local que aumenta los marcadores de inflamación sistémica.

3. Reacción cruzada de anticuerpos frente a bacterias orales con células endoteliales.
4. Efectos trombogénicos.

1.D.1.1. *Bacteriemia*

Este mecanismo se justifica en el hecho de que se ha podido demostrar evidencia de bacterias periodontales en placas ateroscleróticas de arterias coronarias (Rath et al. 2014) y bacterias como *P. gingivalis* en células endoteliales de las arterias coronarias y en la sangre tras la rotura de la placa. Entre las acciones que desempeñan las bacterias periodontales directamente en la lesión aterosclerótica se encuentra provocar disfunción endotelial (Amar and Engelke 2015), con expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas que fomentan el reclutamiento de monocitos y favorecen la inflamación y depósito de LDL (Gibson et al. 2006).

Por otro lado, en pacientes con enfermedad periodontal se han detectado altas concentraciones séricas de lípidos proaterogénicos, como LDLs, vLDLs (*very low-density lipoproteins*) y triglicéridos, posiblemente debidas a un incremento de la producción de colesterol en el hígado como respuesta a los LPS bacterianos y a la reacción de fase aguda que se produce como consecuencia de la inflamación. Estos lípidos posteriormente son capaces de acumularse en el interior de la íntima arterial y promover el proceso aterosclerótico. Por último, además de la presencia de dislipidemia en pacientes con periodontitis (Schenkein et al. 2020), se ha descubierto que *P. gingivalis* favorece la transformación de macrófagos en células espumosas a través del incremento de la captura de partículas LDL,

gracias a la sobreexpresión de un tipo de receptor de superficie y la reducción de la salida de colesterol de los macrófagos (Hajishengallis 2014b).

Diversos estudios, de hecho, han correlacionado la carga microbiológica de bacterias periodontopatógenas con el grosor de la túnica íntima y media (Desvarieux et al. 2005). Además, concretamente en el caso de la *P. gingivalis*, este aumento se ha demostrado multiplicativo del efecto de la dieta como factor de riesgo coadyuvante (Brodala et al. 2005).

1.D.1.2. *Inflamación local que aumenta los marcadores de inflamación sistémica*

La inflamación sistémica está mediada por moléculas inflamatorias, algunas de las cuáles son producidas en la inflamación localizada en el periodonto (Hasturk and Kantarci 2015). Las citoquinas de la respuesta innata (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y quimioquinas inflamatorias secretadas en los tejidos periodontales enfermos pasan al torrente sanguíneo teniendo repercusiones sistémicas a nivel del endotelio vascular con reclutamiento de monocitos y depósito de LDL. En respuesta al aumento de inflamación sistémica, el hígado también desarrolla una respuesta de fase aguda, con secreción de diferentes proteínas, incluyendo CRP (que se considera uno de los principales marcadores de riesgo cardiovascular), fibrinógeno y amiloide A sérico. Estas proteínas son capaces de promover la aterosclerosis al favorecer la producción de moléculas de adhesión endotelial y citoquinas proinflamatorias (Schenkein and Loos 2013; Hajishengallis 2014b).

1.D.1.3. *Reacción cruzada de anticuerpos frente a bacterias orales con células endoteliales*

Consiste en el reconocimiento de proteínas propias del huésped como extrañas por parte de ciertos anticuerpos producidos frente a las bacterias periodontales debido a la similitud de dichas proteínas con las moléculas del patógeno. Esto ocurre, por ejemplo, con los autoanticuerpos frente a las proteínas de choque térmico (HSPs, *heat-shock proteins*) (Gibson et al. 2006). Estos anticuerpos pueden incrementar la inflamación y promover así el proceso aterosclerótico (Schenkein and Loos 2013; Cekici et al. 2014).

1.D.1.4. *Efectos trombogénicos*

Además de lo anterior, infecciones locales o sistémicas pueden tener efectos trombogénicos que, en caso de alcanzar zonas debilitadas o con placas ateromatosas en desarrollo pueden agravarlas o contribuir a sus efectos negativos.

Esta trombogénesis puede clasificarse en:

- Inespecífica. El fibrinógeno y lipoproteínas plasmáticas son activados de forma inespecífica por las infecciones locales o sistémicas, contribuyendo a un aumento de la viscosidad de la sangre.
- Específica: Además, algunas bacterias periodontopatógenas liberan proteínas de agregación plaquetaria (PAAP) que favorecen la formación de coágulos; de modo similar, las plaquetas se activan y unen en presencia de *Streptococcus*

sanguis y *P. gingivalis*, contribuyendo en ambos casos a la formación de trombos (Hajishengallis and Chavakis 2021).

Por todo lo expuesto, podemos indicar que en la asociación entre enfermedad periodontal y aterogénesis nos encontramos ante muchos de los criterios de causalidad de Bradford-Hill, como son la consistencia, plausibilidad, coherencia, analogía, y gradiente biológico, si bien faltaría aún por confirmar otras especialmente relevantes como la temporalidad y reversibilidad (Hill 1965).

A modo de resumen (**Figura 3**), existen una serie de factores de riesgo genéticos y ambientales que conducen a una condición de hiper-respuesta inflamatoria de tal forma que generará, por un lado, una respuesta local en el tejido periodontal frente a la flora del surco resultando en la destrucción del tejido conectivo y óseo con las manifestaciones clínica propias de la enfermedad periodontal. Por otro lado, esa misma hiper-respuesta inflamatoria contribuye al desarrollo propio de la placa de ateroma de forma directa y también indirecta a través de la respuesta que se genera por la flora patógena periodontal que mediante los fenómenos de bacteriemia y liberación de factores de virulencia contribuirá también a la aterogénesis.

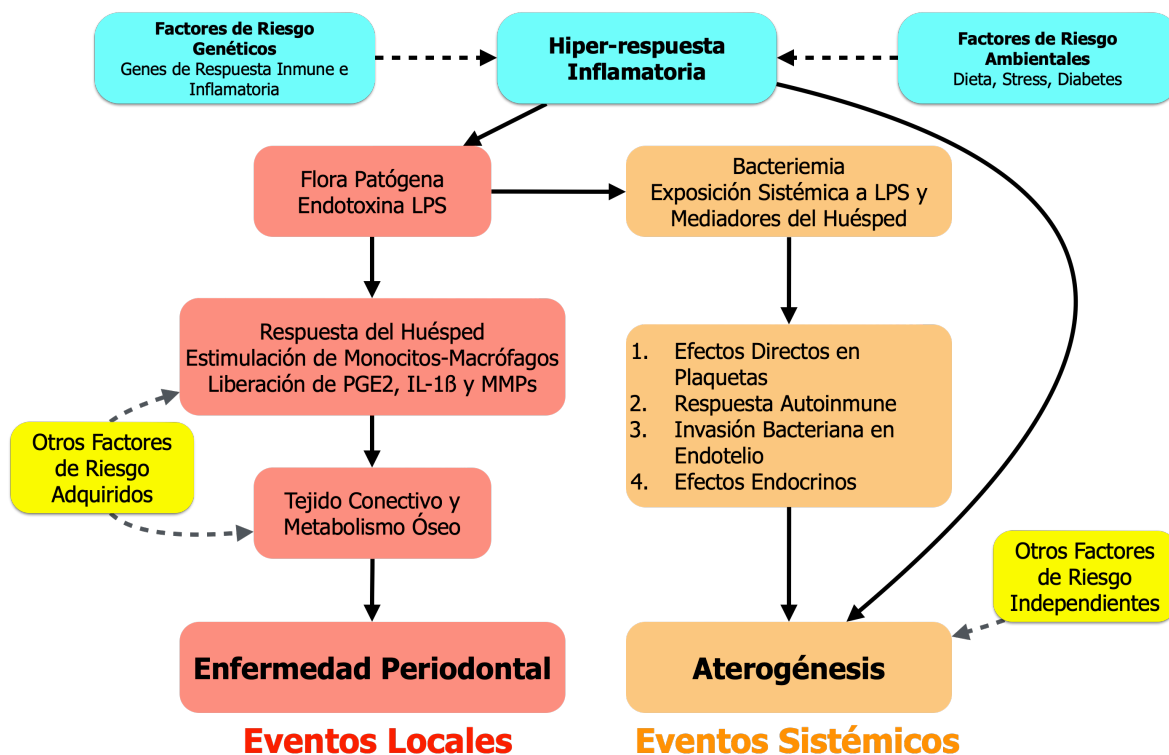


Figura 3: Diagrama resumen de los mecanismos biológicos de interacción entre la enfermedad periodontal y la aterogénesis.

Con todo ello, ya en 2012, la *American Heart Association* y la *European Society on Cardiology* reconocieron a la enfermedad periodontal como un factor de riesgo adicional para la aterosclerosis e independiente de otros factores comunes como edad, género, educación, tabaco, alcohol, hipertensión, y estrés, en cuya asociación posiblemente participe una respuesta inflamatoria común. Por tanto, aunque la asociación causal no quede establecida de forma clara ni, según estos expertos, haya datos concluyentes que prueben que la intervención de la enfermedad periodontal prevenga la enfermedad aterosclerótica ni sus consecuencias ni las posibles vías, sí hay un efecto claro en la reducción de la inflamación sistémica y la mejora de la disfunción endotelial (Lockhart et al. 2012; Perk et al. 2012). Así, el consenso común de la *European Federation of Periodontology* y la *American Academy of Periodontology* sobre Periodontitis y Enfermedades Sistémicas recomendó la realización de estudios intervencionales

novedosos y bien diseñados para contribuir al avance del conocimiento en el campo (Tonetti et al. 2013).

1.E. PERIOSTIN

En el mantenimiento periodontal son especialmente relevantes las proteínas matricelulares y, en concreto, periostin (gen POSTN), una proteína de 835 aminoácidos y 90kDa de la familia de la fasciclinas (Horiuchi et al. 1999). De hecho, presenta, en su secuencia, una sucesión de dominios estructurales EMI, repetición de 4 dominios FAS y terminación en la región C-terminal (Khurshid et al. 2020). Su expresión está regulada por la estimulación mecánica que escinde una fracción extracelular del TGF- β 1 latente (factor de crecimiento transformante beta 1), de tal forma que, a través de sus receptores en la membrana celular, estimulan la activación citosólica de SMAD (familia de proteínas de factores de transcripción) y MAPK/ERK (vía de señal extracelular regulada por kinasas), que a su vez inducen la producción de Twist1; Twist1 también es estimulado a través de la unión de TGF- β 1 con integrinas Alpha v - Beta 3 de la membrana celular y la activación de la vía FAK/src. La producción de Twist1 es la responsable directa del aumento de la síntesis de periostin.

Esta proteína no lleva a cabo un papel estructural, sino que realiza funciones reguladoras debido a la interacción con proteínas de la matriz extracelular e integrinas cambiando el fenotipo celular y la función (Conway et al. 2014; Frangogiannis 2019). Así, podemos describir que su principal función consiste en la interacción con el colágeno durante la fibrillogénesis para aumentar su entrecruzamiento (Garnero 2012). Para ello, a través de sus dominios FAS y EMI

interacciona con la fibronectina y BMP1, inducidas a su vez por mecanismos pro-inflamatorios como IL-4, IL-13 o la propia TGF- β 1, dando como resultado la activación de la lisil-oxidasa, que es la encargada de entrecruzar las moléculas de colágeno generando enlaces de lisina en los compuestos piridinolin (**Figura 4**). El resultado es un aumento en la resistencia mecánica del tejido al generar fibras de colágeno de mayor diámetro (Norris et al. 2007).

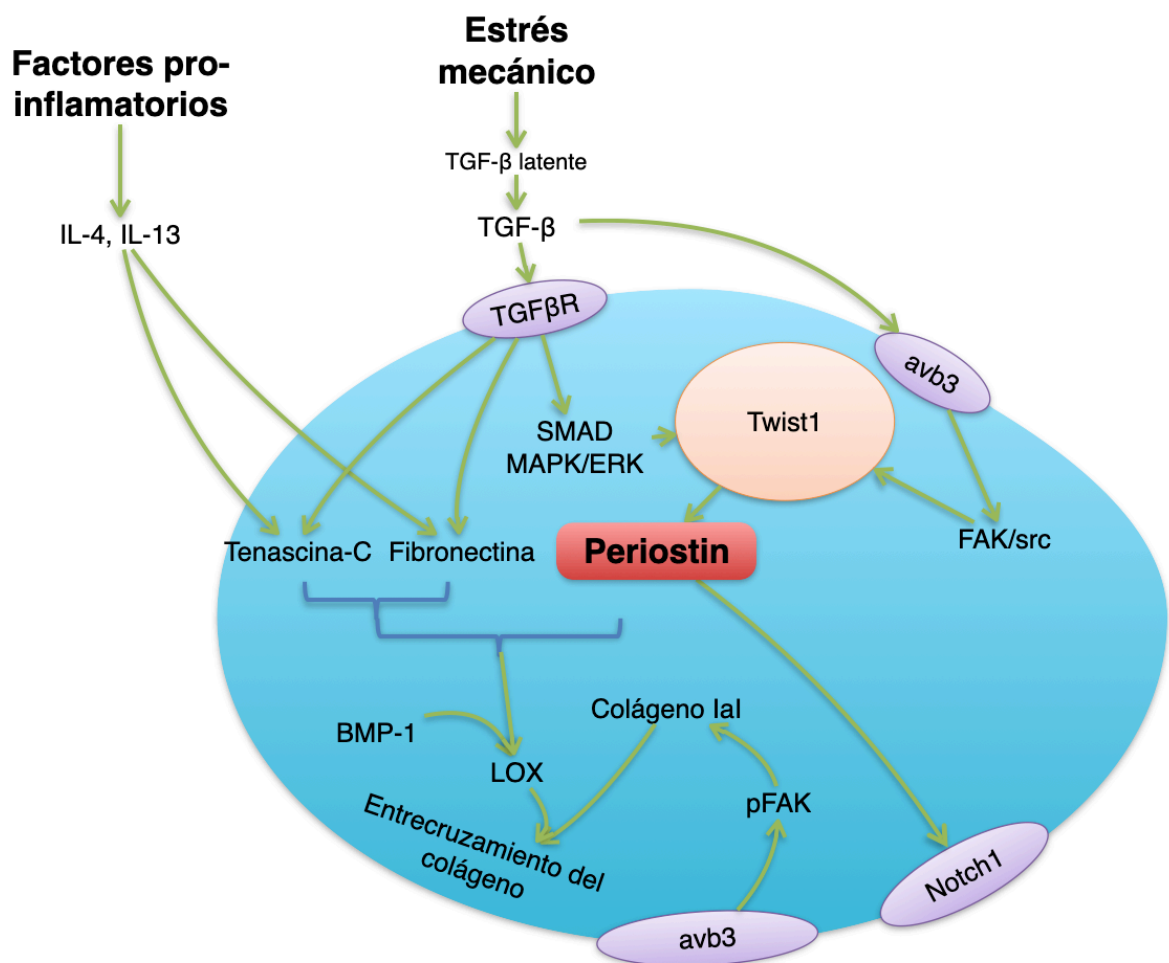


Figura 4: Representación esquemática de las vías de inducción de la producción de periostin y su función principal.

Por este motivo funcional principal, periostin se expresa en diversos tejidos con alto contenido en colágeno como el periostio y válvulas cardíacas. Además, interviene en el desarrollo embrionario y la formación de huesos (Bonnet et al.

2009; Bonnet et al. 2013; Bonnet et al. 2016). Es especialmente específica del ligamento periodontal (**Figura 5**) (Hamilton 2008), donde juega un papel esencial para su mantenimiento (Rios et al. 2005; Rios et al. 2008). En cualquier caso, periostin se ha descrito como una proteína multifuncional que desempeña diferentes funciones tanto en procesos fisiológicos como patológicos, siendo el remodelado tisular como respuesta al daño el denominador común de todos ellos (Conway et al. 2014).

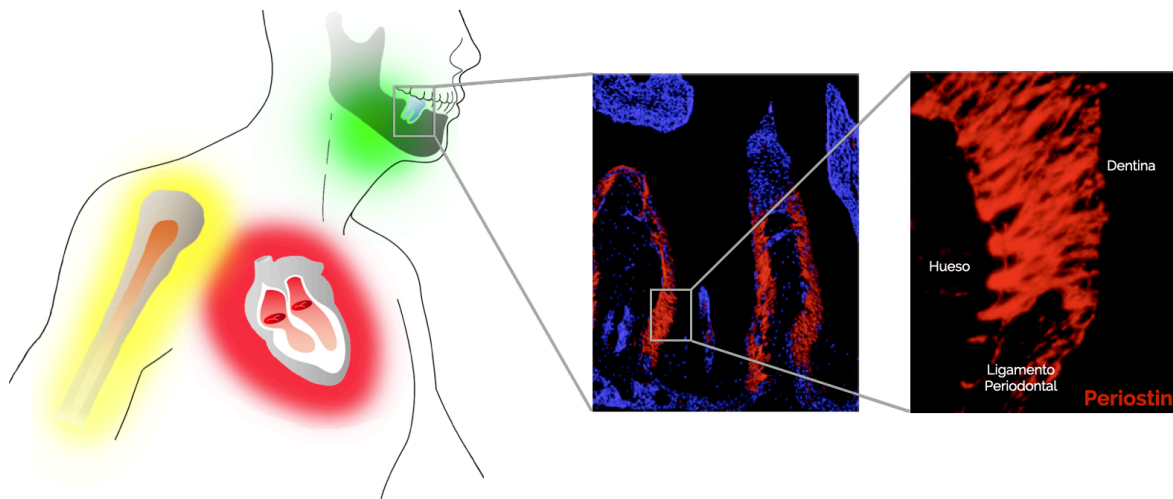


Figura 5: Diferentes tejidos en los que podemos encontrar periostin, fundamentalmente, y su alta especificidad por el ligamento periodontal (en rojo) en una imagen de inmunofluorescencia. Se observa de forma detallada la distribución siguiendo la estructura fibrilar del ligamento y específicamente de los haces de fibras de colágeno que se insertan en el hueso y en la dentina.

1.E.1. Periostin en ligamento periodontal

Las investigaciones iniciales sobre periostin y el desarrollo cardíaco llevaron a la generación de ratones knock-out (KO) para esta proteína. Su estudio detallado demostró la presencia de alteraciones en la formación de los dientes, con frecuentes fallas estructurales y de mineralización, especialmente incisivos, que son de crecimiento continuo en los roedores, junto con procesos de reabsorción

radicular externa. Además, cuando los molares entraban en oclusión tras la erupción aparentemente normal, se desarrollaban lesiones periodontales descontroladas y que se asemejaban mucho a las ocurridas en la enfermedad periodontal (**Figura 6**) (Rios et al. 2005; Rios et al. 2008). A nivel histológico, el proceso inflamatorio podría asemejarse también al proceso que puede detectarse en una enfermedad periodontal crónica.

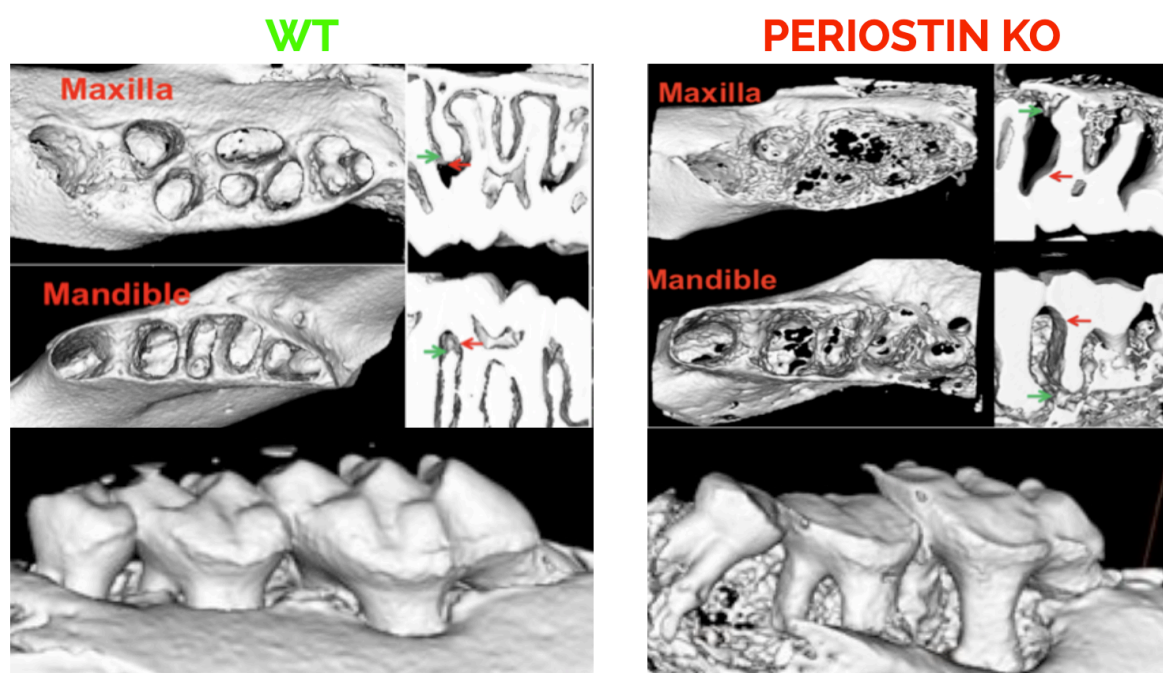


Figura 6: Imagen por microtomografía computarizada de las estructuras alveolares y dentarias en ratones normales (wild-type; WT) y knock-out para periostin. Se observa la integridad de la estructura del hueso alveolar en el primero de los casos en contraposición a la destrucción severa en el segundo.

De ahí, surgieron líneas de trabajo en las que pudieron demostrarse, en el ámbito periodontal, tanto *in vitro*, en animales y clínicamente con pacientes, algunos aspectos interesantes.

En el periodonto, periostin es producido por fibroblastos especializados gingivales y del ligamento periodontal. Así, el primero de los estudios demostró que la expresión de periostin *in vitro* por parte de células fibroblásticas de ligamento periodontal disminuye por el efecto de factores de virulencia bacterianos, concretamente lipopolisacáridos de *P. gingivalis*, y pro-inflamatorios, concretamente el factor de necrosis tumoral Alpha (TNF- α). Este efecto negativo fue aún más evidente cuando se empleó la combinación de ambos factores deletéreos (Padial-Molina et al. 2013). *In vivo*, se desarrolló un estudio en animales a los que se indujo una situación de enfermedad periodontal mediante ligaduras con hilos de seda alrededor de los molares. El análisis mediante microtomografía computarizada, histología convencional, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia demostró una correlación negativa entre los niveles de expresión de periostin y el infiltrado inflamatorio y destrucción del hueso alveolar. Esto sirvió para sugerir un rol protector de periostin frente a la patogénesis de la enfermedad (Padial-Molina et al. 2012). De hecho, a continuación se desarrolló otro estudio en el que se evaluaron muestras humanas de tejido periodontal sano (extraído por motivos estéticos) en comparación con muestras obtenidas durante la realización de tratamiento quirúrgico de la enfermedad periodontal. Este estudio confirmó la distribución normal de periostin de forma evidente en el tejido siguiendo una alineación fibrilar acompañando a los haces de fibras de colágeno. Por el contrario, en tejido enfermo, la distribución de periostin, además de ser más leve, fue más difusa. En el fluido crevicular y en suero, por el contrario, los niveles de periostin no sólo no siguieron este patrón sino que de hecho fueron más elevados en pacientes con enfermedad (Padial-Molina et al. 2015). Resultados similares, en suero, han sido también observados por otros estudios (Balli et al. 2015). El tratamiento periodontal aumentó los niveles de periostin en fluido crevicular (GCF), especialmente en pacientes enfermos, aunque de forma transitoria, por lo que se

propuso que se trataría de un aumento con objeto de asistir en la curación postquirúrgica (Padial-Molina et al. 2015).

La implicación de periostin en los procesos de curación de heridas fue objeto también de una serie de trabajos por parte del mismo grupo. Por su distribución en salud y enfermedad, periostin fue usado como marcador de funcionalidad periodontal en tejidos mecánicamente competentes tras procesos de regeneración (Park et al. 2012; Park et al. 2014). Pero, además, se pudo demostrar que periostin es capaz de promover la migración, proliferación y supervivencia celular de células del ligamento periodontal (Padial-Molina et al. 2014) así como células epiteliales (Rosselli-Murai et al. 2013) a través de interacciones con integrinas, activándose la ruta celular AKT/PKB/mTOR. En ambos casos, el aporte externo de periostin fue capaz de recuperar los efectos negativos del tratamiento con factores inflamatorios y derivados bacterianos. Resultados similares respecto a la dificultad en la curación de heridas cutáneas han sido también observados por otros estudios (Nishiyama et al. 2011; Nikoloudaki et al. 2020).

Por tanto, en resumen, como se ha descrito, periostin parece esencial para la función y mantenimiento estructural de las estructuras de soporte del diente en condiciones de salud. En este tejido, con altísimos requerimientos mecánicos, así como en otros en los que está presente de forma normal, periostin juega ese papel indispensable ya que estaría en un continuo intento de compensación del daño generado. Sin embargo, en otros tejidos, el mantenimiento de la expresión elevada más allá del tiempo necesario conduciría a situaciones patológicas, ocasionando procesos fibróticos, con la consecuente alteración de la función normal (Conway et al. 2014; Walker et al. 2016; Nikoloudaki et al. 2020). Periostin

promueve, en algunos tejidos donde no es normal que se exprese, la aparición de fibrosis, lo que en ciertos tejidos altera su estructura y función, como en alergia (Izuhara et al. 2014), asma (Jia et al. 2012), enfermedades renales (Mael-Ainin et al. 2014) y metástasis (Contie et al. 2011), entre otras (Walker et al. 2016; Yang et al. 2022).

1.E.2. Periostin en el sistema cardiovascular

En el sistema cardiovascular, origen como se mencionó anteriormente de muchas de las investigaciones realizadas sobre esta molécula, periostin es necesario y altamente expresado durante el desarrollo cardíaco. De hecho, ratones KO presentan hasta un 15% de mortalidad temprana post-nacimiento debido a problemas relacionados con insuficiencias cardíacas y otras cardiopatías (Conway and Molkentin 2008). En el corazón adulto, sin embargo, periostin no se expresa a niveles especialmente elevados, pero aumenta tras eventos agudos en los que se hace necesaria una estabilización del tejido habiendo demostrado incluso la capacidad de inducir la re-entrada al ciclo celular de cardiomiocitos (Dorn 2007; Kuhn et al. 2007; Shimazaki et al. 2008; Polizzotti et al. 2012; Wang et al. 2012). A corto plazo, esto ocasiona una remodelación fibrótica (Teekakirikul et al. 2010; Zhao et al. 2014) y la subsecuente pérdida de función (Katsuragi et al. 2004; Asakura and Kitakaze 2009; Cheng et al. 2012; Ling et al. 2014).

En base a ello, se ha sugerido su uso como marcador de la severidad del daño cardíaco (Liu et al. 2013; Ling et al. 2014; He et al. 2018). De hecho, se han detectado niveles elevados de periostin circulante tras infarto agudo de

miocardio (Tin et al. 2023). El mantenimiento de estos niveles elevados se correlacionó también con riesgo aumentado de nuevos eventos cardíacos (Ling et al. 2014). Una posible explicación sugiere que periostin puede contribuir a un aumento de la vulnerabilidad de los cardiomiocitos frente al infarto agudo de miocardio al aumentar (Hu et al. 2022), aunque periostin también induce el reclutamiento de cardiomiocitos a la zona infartada. Según esto, debe existir un balance entre el efecto beneficioso y niveles bajos que eviten el proceso de fibrosis (Conway et al. 2014). Como debe ser esperado, en esta secuencia de acciones y resultados, el tiempo juega un papel fundamental. Así, en las primeras etapas, durante los primeros días, periostin contribuye a la generación de la cicatriz y fibrosis en la zona infartada con objeto de prevenir la ruptura de la pared ventricular, efecto que se mantiene hasta 7 días, cuando comienza a disminuir y vuelve a los niveles basales tras 28 días (Gil et al. 2022).

En placas ateroscleróticas periostin está aumentado (Bagnato et al. 2007) y contribuye a la aterogénesis (Hixson et al. 2011) al aumentar la migración de células de la musculatura lisa (Li et al. 2010), remodelación de la capa adventicia (Wang et al. 2022), angiogénesis y producción de MMPs (Hakuno et al. 2010) así como la calcificación de la placa (Alesutan et al. 2022). Todo ello aumenta el riesgo de enfermedad coronaria aterosclerótica (Wang et al. 2011; He et al. 2018).

No existen datos sobre la existencia de pacientes incapaces de expresar periostin ni sobre los niveles medios que puedan ser considerados representativos de salud. Sin embargo, la relevancia de periostin tanto en el tejido periodontal como en la aterogénesis, el hecho de que pacientes con periodontitis presenten un aumento en los niveles de periostin en suero, inversamente correlacionados con

los niveles en GCF, y que la reducción en los niveles de periostin observada tras el tratamiento quirúrgico de la enfermedad periodontal podría contribuir a reducir los efectos negativos a distancia, hacen que el estudio de su papel en la posible interacción entre ambas enfermedades sea necesario. El estudio, metodología y resultados presentados a continuación han sido publicados recientemente en una revista internacional en el modo acceso abierto (Padial-Molina et al. 2023).

HIPÓTESIS



2. HIPÓTESIS

La hipótesis general del presente estudio, como muestra la **Figura 7**, es que la reducción de los niveles de periostin tras el tratamiento de la enfermedad periodontal es proporcional a la mejora de los marcadores sistémicos de enfermedad cardiovascular por aterosclerosis.

Esto se basa en que la interacción de ambas enfermedades mediante periostin es plausible biológicamente ya que periostin es necesario a nivel local para el mantenimiento del ligamento periodontal, mientras que, a nivel sistémico, aumenta en procesos de fibrosis vascular e invasión endotelial en placas de ateroma. Así, la reducción de periostin sistémico tras el tratamiento periodontal reduciría los estímulos negativos que ejerce a nivel vascular en la enfermedad aterosclerótica.

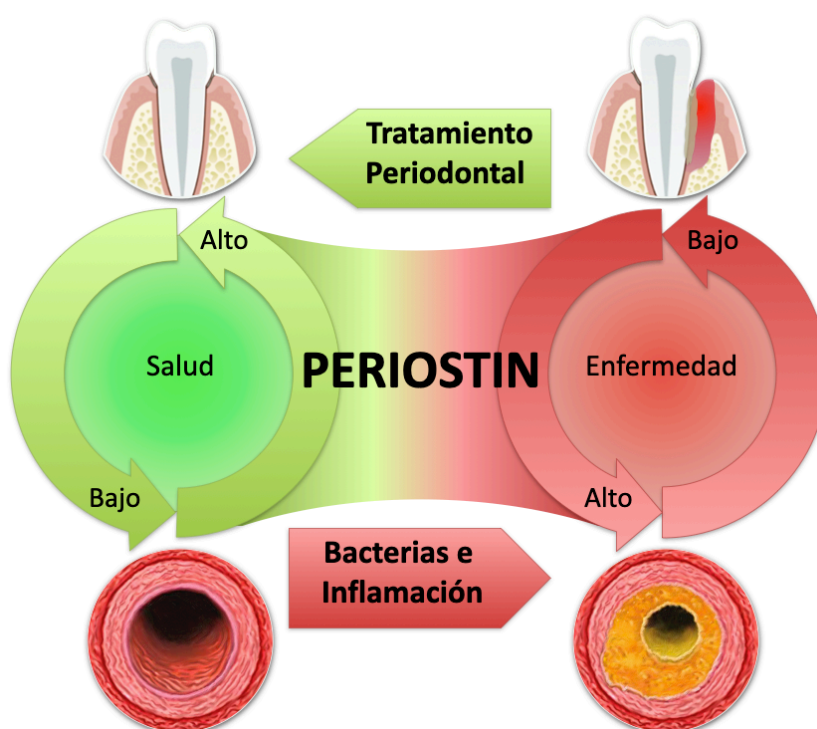


Figura 7: Representación esquemática de la hipótesis de estudio.



OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

El objetivo global de la presente Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto del tratamiento de la enfermedad periodontal en la enfermedad aterosclerótica coronaria a través de los niveles circulantes de periostin.

Esta vía de interacción entre periodontitis y aterosclerosis se analizó mediante un estudio clínico aleatorizado en pacientes periodontales con aterosclerosis coronaria tratados con terapia quirúrgica periodontal o no quirúrgica mediante raspado y alisado radicular.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos de trabajo:

1. Evaluar los niveles basales de periostin en suero y fluido crevicular en pacientes con aterosclerosis coronaria y enfermedad periodontal concomitante.
2. Analizar las variaciones de periostin en suero y fluido crevicular a lo largo del tiempo en pacientes con aterosclerosis coronaria tras recibir tratamiento para la enfermedad periodontal.
3. Evaluar el impacto de la cirugía periodontal en las concentraciones de distintos marcadores de periodontitis y aterosclerosis, observando su variación a lo largo del tiempo y comparándolos con los del tratamiento no quirúrgico.



METODOLOGÍA



4. METODOLOGÍA

4.A. DISEÑO Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo fue diseñado como un estudio clínico aleatorizado de intervención en el que se comparó la terapia quirúrgica periodontal con un comparador no quirúrgico en que se realizó tratamiento periodontal mediante raspado y alisado radicular. Se diseñó para incluir pacientes con enfermedad periodontal y enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias. El estudio fue diseñado según los criterios de la Guía CONSORT (Schulz et al. 2010).

El estudio fue realizado reclutando pacientes tanto en el Servicio de Cardiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada) como en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, donde además se realizó el tratamiento periodontal y recogida de muestras y datos clínicos. El análisis de muestras se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada. Por este motivo, se solicitó evaluación de los aspectos éticos y se obtuvo aprobación tanto por parte del Comité de Ética en Investigación Humana de Granada (Junta de Andalucía, España), quedando registrado el estudio con número 0296-M1-16, como por parte del Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada, quedando registrado con número 937. Además, antes de comenzar el estudio, se registró el protocolo en el International Standard Randomized Controlled Trial Number con número de registro ISRCTN17884414 (<https://doi.org/10.1186/ISRCTN17884414>).

Así, los pacientes interesados en participar en el estudio fueron informados de forma exhaustiva sobre los objetivos, procedimientos, riesgos, beneficios, expectativas, compromisos, derechos y responsabilidades antes de firmar de forma voluntaria su consentimiento para participar en el estudio.

4.B. CALIBRACIÓN Y ENTRENAMIENTO

Se consideró como standard uno de los directores de esta Tesis Doctoral, siendo la Doctoranda la evaluadora calibrada. Los pacientes participantes en los ejercicios de calibración fueron recompensados por su tiempo mediante la realización de una limpieza bucal gratuita.

Previo al reclutamiento de pacientes, se realizó una sesión de calibración en 3 pacientes no participantes en el estudio. En ella, se estandarizaron criterios de recogida de datos y se homogeneizó la realización del periodontograma. El examen, que se repitió con un margen de 2 horas, consistió en la realización de un periodontograma completo con medición de:

- Profundidad de sondaje (PD): distancia desde el margen gingival (GM) hasta el fondo de la bolsa gingival.
- Recesión gingival (GR): distancia desde el GM a la unión amelo-cementaria (CEJ) u otro punto fijo de referencia en el diente como margen de prótesis o restauraciones, en caso de existir y/o alterar la detección del CEJ. Se utilizaron valores positivos cuando la posición del margen estaba coronal a

la referencia (sobrecrecimiento) y negativos cuando el margen estaba en una posición apical respecto a la referencia (recesión gingival).

- Nivel de inserción clínica (CAL = PD+GR).
- Sangrado al sondaje (BOP): se registró de forma dicotómica, como presente o ausente.

Dichas medidas se realizaron en 6 sitios por diente (mesio-bucal, bucal, disto-bucal, disto-lingual, lingual y mesio-lingual) con una sonda periodontal milimetrada en todos los dientes naturales excepto terceros molares. Además, se analizaron de 3 radiografías periapicales para medir la distancia entre un punto fijo en el diente y la cresta ósea interdientaria.

Para que el ejercicio de calibración y entrenamiento fuese exitoso, se estableció que tanto para las medidas clínicas como radiográficas se debería obtener un mínimo de un 90% de reproducibilidad (± 1 mm) intra-examinador y 80% inter-examinador frente al "gold standard", que en este caso fue uno de los Directores de la presente Tesis Doctoral. Dichos niveles fueron alcanzados sin dificultad ni necesidad de recalibración.

4.C. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para llevar a cabo este estudio se contó con la participación de personas adultas que previamente a su inclusión firmaron un consentimiento informado. En base a nuestros estudios previos (Padial-Molina et al. 2015), se consideró necesario incluir a un total de 10 pacientes por grupo, teniendo en cuenta, además, que al

no haberse estudiado antes la interacción propuesta, el estudio se consideró de tipo piloto.

Los criterios de inclusión se definieron para seleccionar individuos de ambos géneros en edades comprendidas entre los 18 y los 75 años que hubieran sido diagnosticados con enfermedad periodontal crónica severa, actualmente clasificada como enfermedad periodontal localizada o generalizada de estadio III, grado B (Tonetti et al. 2018), con necesidad de tratamiento quirúrgico (Sanz et al. 2020); concretamente debían presentar al menos un cuadrante con 6 o más dientes naturales que no necesitasen ser extraídos excluyendo terceros molares, con más del 10% de sitios con sangrado al sondaje (BOP) y más del 30% de los dientes con más de 6 mm de profundidad de sondaje (PD). Además, los pacientes debían también presentar enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias definida por presencia de estenosis de una arteria coronaria $\geq 50\%$ o por haber sufrido un evento coronario entre los 6 y 36 meses anteriores, incluyendo infarto agudo de miocardio o intervención para realización de bypass o colocación de stent en alguna o varias arterias coronarias.

Los candidatos fueron excluidos si habían sufrido un evento coronario en un periodo de 6 meses anterior al estudio, si presentaban fallo renal (creatinina $> 1.5\text{mg/dl}$), enfermedad hepática o pulmonar descontrolada, tumor maligno, enfermedad autoinmune, trastorno neurológico o psiquiátrico, diabetes mellitus descontrolada, enfermedad infecciosa (distinta de la enfermedad periodontal), si habían recibido terapia antibiótica o periodontal en los 3 meses anteriores al estudio, si tenían historial de alcoholismo o abuso de drogas o si presentaban alguna otra condición oral que debiese ser tratada o lo estuviese siendo (como tratamiento ortodóntico, caries, etc.).

Adicionalmente, una vez incluidos en el estudio y durante el periodo de seguimiento, se establecieron unos criterios de exclusión secundarios que consistieron en la detección de una progresión de la enfermedad periodontal de más de 2 mm en la reevaluación a los 3 meses, infarto o re-infarto con o sin necesidad de intervención, o necesidad de re-intervención cardiovascular.

4.D. PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIO

Los individuos se agruparon de manera aleatoria en dos grupos: grupo de terapia quirúrgica periodontal, cuyos miembros recibieron, en el cuadrante en peor estado, tratamiento quirúrgico para la enfermedad periodontal mediante reducción de las bolsas periodontales con colgajo de acceso o de Widman modificado y cirugía ósea cuando fue preciso (Sanz et al. 2020), así como tartrectomía completa, con retirada de sutura tras 7 días, y un grupo no quirúrgico, en el que se implementó una terapia no quirúrgica con raspado y alisado radicular completo en una sesión.

Cuando fue necesario, se prescribió terapia analgésica-antiinflamatoria y antibiótica. En todos los casos, se indicaron las recomendaciones postoperatorias, medidas de higiene oral y uso de enjuagues de clorhexidina durante dos semanas.

La **Tabla 1** muestra de forma esquemática los procedimientos realizados, así como su temporización y distribución por visitas.

Tabla 1: Descripción ilustrativa de los procedimientos a realizar en cada visita y su temporización.

VISITAS PROCEDIMIENTOS	Visita 1 (Inclusión)	Visita 2 (Inicio)	Visita 3 (7 días)	Visita 4 (2 semanas)	Visita 5 (4 semanas)	Visita 6 (3 meses)	Visita 7 (6 meses)
Consentimiento Informado							
Historia Médica y Dental, Instrucciones de higiene oral							
Presión arterial, BMI, glucemia							
Examen Periodontal (Periodontograma)							
Radiografía							
Fluido Gingival, Sangre							
Tartrectomía completa							
Cirugía Periodontal (grupo test)							
Retirada de sutura (grupo test)							
Duración de la visita	2 h	3 h	0.5 h	1 h	1 h	2 h	3 h

4.E. RECOGIDA DE DATOS Y MUESTRAS

Esquemáticamente, hemos resumido la secuencia de actuaciones y datos a recoger en la **Figura 8**.

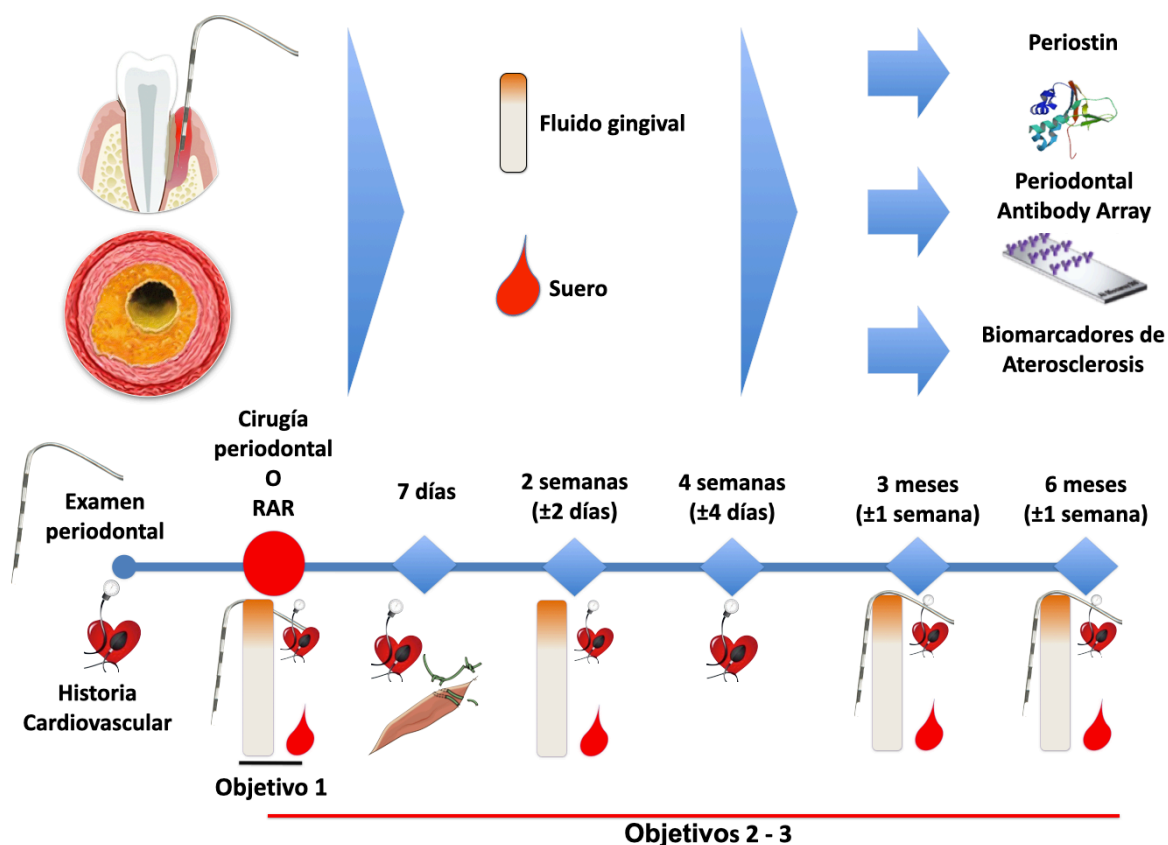


Figura 8: Secuencia de recogida de datos y muestras, así como indicación del objetivo al que se corresponden.

4.E.1. Examen clínico

En una primera visita, se registró una historia oral y médica completa, que incluía edad, sexo, nivel máximo de estudios, diabetes, tipo y tiempo transcurrido desde el evento cardiovascular y altura. Además, tanto en la primera como en el resto de las visitas, se registraron los hábitos tabáquicos y de consumo de alcohol, peso, índice de masa corporal (IMC), presión arterial en reposo y glucemia.

A continuación, en la primera visita, así como a los 3 y 6 meses, se realizó un examen oral y periodontal que consistió, al igual que durante la calibración, en la realización de las siguientes medidas en 6 sitios por diente (mesio-bucal, bucal,

disto-bucal, disto-lingual, lingual y mesio-lingual) con una sonda periodontal milimetrada en todos los dientes naturales excepto terceros molares:

- Profundidad de sondaje (PD): distancia desde el margen gingival (GM) hasta el fondo de la bolsa periodontal.
- Recesión gingival (GR): distancia desde el GM a la unión amelo-cementaria (CEJ) u otro punto fijo de referencia en el diente como margen de prótesis o restauraciones, en caso de existir y/o alterar la detección del CEJ. Se utilizaron valores positivos cuando la posición del margen estaba coronal a la referencia (sobrecrecimiento) y negativos cuando el margen estaba en una posición apical respecto a la referencia (recesión gingival).
- Nivel de inserción clínica (CAL = PD+GR).
- Sangrado al sondaje (BOP): se registró de forma dicotómica, como presente o ausente.

Se anotaron, además, los índices de inflamación gingival y placa (Löe 1967) en 4 áreas por diente (mesial, bucal, distal y lingual):

- Índice gingival:
 - o 0 = Encía normal.
 - o 1 = Inflamación leve sin sangrado.
 - o 2 = Inflamación moderada con BOP.
 - o 3 = Inflamación severa con sangrado espontáneo.
- Índice de placa:
 - o 0 = No placa.
 - o 1 = Placa detectable con sonda.
 - o 2 = Acumulación evidente.
 - o 3 = Acumulación abundante.

Tras el tratamiento y hasta las 4 semanas, se registró la cicatrización de la herida (WHI) como (Morelli et al. 2011):

- 0 = Cicatrización madura de la herida.
- 1 = Eritema.
- 2 = Hemorragia espontánea.
- 3 = Movilidad del colgajo.
- 4 = Supuración.
- 5 = Necrosis.

Finalmente, tras el tratamiento y también hasta las 4 semanas, los pacientes registraron el dolor general en una escala de 100 mm donde 0 indicaba ningún dolor y 100 indicaba el máximo dolor imaginable. La medición en milímetros de esta escala fue registrada en el formulario.

4.E.2. Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras procedentes de dos orígenes distintos: fluido crevicular (GCF) y sangre, que fue centrifugada para obtener el suero. El primer tipo de muestras de recogió en cada visita desde la visita inicial mientras que la sangre se extrajo sólo el día de la intervención, a las 2 semanas y a los 3 y 6 meses.

4.E.2.1. Fluido crevicular (GCF)

La toma de fluido crevicular se realizó siguiendo la misma metodología que en estudios previos y que de hecho está ampliamente avalada por la literatura

(Padial-Molina et al. 2015). El procedimiento consiste en aislar la zona mediante torundas de algodón, secar ligeramente con aire y eliminar la placa supragingival blanda mediante un instrumento suave evitando en todo momento interferir con el surco. Posteriormente, se inserta cuidadosamente la tira de papel (PerioPaper) en el surco gingival y se deja en posición durante 30 segundos. Inmediatamente después, las tiras son extraídas y almacenadas en tubos Eppendorf a -80°C hasta el procesamiento para el análisis.

4.E.2.2. Suero

Para la obtención de suero, primero se extrajo un volumen de 10 ml de sangre venosa periférica mediante punción venosa braquial, que se recolectaron en tubos de extracción de sangre BD Vacutainer®. Inmediatamente se procedió a la separación en plasma y suero mediante centrifugación durante 10 min a 1000 g. El suero sobrenadante se recolectó y almacenó a -80°C hasta su análisis. El plasma fue descartado.

4.E.3. Tratamiento y análisis de muestras

Las muestras de GCF obtenidas en las tiras de papel se prepararon para el análisis a través de un procedimiento con distintos lavados y centrifugaciones. Concretamente, la extracción de fluido de la tira de papel se realizó mediante la impregnación con una solución preparada de la siguiente forma. A 49 ml de PBS ("*phosphate buffered saline*", tampón salino fosfatado), se añadieron 250 μl , es decir, de PMSF ("*phenylmethanesulfonyl*") preparado en metanol a concentración 200mM, 500 μl de aprotinina en concentración 1mg/ml en agua

destilada y 167 μ l de albúmina humana al 30%. Con esta solución, se realizaron lavados de cada tira, en tubos separados, con volúmenes sucesivos de 20 μ l y centrifugación a 2000rpm, 4°C, durante 5 minutos. Con la realización de un total de 5 lavados se obtuvo un volumen final de 100 μ l. Esta solución final se congeló nuevamente a -80°C hasta su análisis. Las muestras de suero no necesitaron preparación previa salvo dilución en caso necesario según el kit a utilizar.

Así, una vez preparadas las muestras de ambas procedencias se procedió a su análisis empleando un test de tipo ELISA-multiplex basado en la tecnología de perlas magnéticas Luminex® xMAP® (EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP, Merck). Utilizamos este tipo de ensayo porque permite analizar múltiples moléculas en la misma muestra a través de su detección por diferentes anticuerpos frente a cada una de ellas, por lo que no requiere de grandes cantidades de muestra, que es una de las limitaciones fundamentales del estudio del GCF. Concretamente se utilizaron 3 kits diferentes para los distintos grupos de marcadores a analizar:

- Kit para citocinas HCYTOMAG-60 K, para detectar IFN- γ , IL-1 β , IL- 6, IL-10, MIP-1 α y TNF- α .
- Kit para marcadores relacionados con la salud cardiovascular HCVD3MAG-67 K, para detectar CRP, fibrinógeno, L-selectina y factor de von Willebrand.
- Kit HCMBMAG-22 K personalizado para incluir sólo periostin.

Los marcadores que fueron analizados en este estudio, así como un breve resumen de sus características, proceso en el que se encuentran implicados y tipo de respuesta, se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Resumen de las principales características de los marcadores analizados en el estudio.

Marcador	Enfermedad	Tipo de respuesta
CRP	Aterosclerosis	Proinflamatoria y pro-aterogénica
Fibrinógeno	Aterosclerosis	Pro-aterogénica
IFN- γ	Periodontitis y aterosclerosis	Respuesta adaptativa pro-inflamatoria
IL-1 β	Periodontitis y aterosclerosis	Respuesta innata pro-inflamatoria
IL-6	Periodontitis y aterosclerosis	Respuesta innata pro-inflamatoria
IL-10	Periodontitis y aterosclerosis	Respuesta innata y adaptativa anti-inflamatoria
L-selectina	Aterosclerosis	Pro-aterogénica
MIP-1 α	Periodontitis	Respuesta innata pro-inflamatoria
TNF- α	Periodontitis y aterosclerosis	Respuesta innata pro-inflamatoria
Factor de von Willebrand	Aterosclerosis	Pro-aterogénica

Para la detección de los marcadores indicados se siguió un protocolo general, según la recomendación del fabricante y que para los tres kits fue similar, a excepción de los parámetros del sistema de lectura, que se introdujeron según lo indicado por el fabricante. En primer lugar, se procedió a la preparación de los reactivos, incluyendo la solución conteniendo las microesferas con anticuerpos inmovilizados, el tampón de lavado y los distintos estándares y diluciones para obtención de las concentraciones conocidas con las que generar la curva patrón; frente a ella se enfrentarán los datos de absorbancia de cada marcador para así obtener la concentración. Una vez preparados los reactivos, primero se realizó el lavado con tampón de los 96 pocillos de la placa proporcionada por el kit. A continuación, se añadieron los estándares y el tampón de ensayo y la solución matriz (según el kit) en los pocillos designados para cada estándar y muestra.

Después se añadieron las muestras de GCF o suero (con las diluciones adecuadas según la recomendación de cada kit). A continuación, se añadieron las microesferas magnéticas. El conjunto fue incubado a 4°C durante toda la noche para, finalmente, realizar los lavados necesarios, añadir los anticuerpos de detección, que se incubaron durante 1 hora, para volver a lavar y añadir la estreptavidina-ficoeritrina e incubar durante otros 30 minutos. Por último, se añadió el tampón de lectura y se procedió a la determinación de la fluorescencia en un aparato Luminex 200. Cada muestra del estudio, así como los estándares, se analizaron por duplicado y al terminar se obtuvo la media de ambas lecturas.

4.F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se debe indicar que la aleatorización se realizó con un protocolo de minimización mediante el software Minimp ya que por el tamaño muestral pretendimos equilibrar la distribución de la edad, el sexo y el hábito de fumar entre ambos grupos de tratamiento.

La recogida de datos se realizó en formularios en papel diseñados específicamente para el estudio. Estos datos fueron transferidos a una hoja Excel (Microsoft® Excel para Mac v16.76) con la que se trabajó para el diseño de gráficos y la tabulación de datos. El software GraphPad Prism 7 for Mac se utilizó también para la realización de algunos gráficos. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software IBM SPSS-MacOS 28.0 (SPSS Inc.).

Los resultados se presentan como media (desviación estándar) para las variables continuas y como porcentaje (frecuencia) para los datos categóricos. El análisis de los mismos, dado el tamaño limitado de la muestra, se realizó, en todos los casos, mediante pruebas no paramétricas. Así, se empleó la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes al analizar las diferencias entre grupos y el análisis bidireccional de varianza por rangos de Friedman para muestras relacionadas con corrección de Bonferroni para comparaciones por pares cuando se evaluaron las diferencias a lo largo del tiempo dentro de cada grupo. Finalmente, se calculó el valor p del coeficiente de correlación de Spearman para las correlaciones entre variables. En todos los casos, se estableció que cuando los valores p fueran inferiores a 0,05 se entendería que las diferencias eran estadísticamente significativas.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.A. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Como muestra la **Figura 9**, que representa el diagrama CONSORT de flujo de pacientes del estudio, se realizó un pre-screening a partir de pacientes que acudían a seguimiento en el Servicio de Cardiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada), así como a partir de historias clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada. En esta etapa, se evaluaron un total de 878 registros o pacientes. Finalmente, se procedió a la firma de consentimiento informado y evaluación clínica de un total de 38 pacientes, de los cuales sólo 22, 11 en cada grupo, cumplían los criterios y fueron incluidos en el estudio. De ellos, en la **Tabla 3** se presentan los datos demográficos y clínicos básicos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para ninguna variable clínica inicial, a excepción de la diabetes, ya que, a pesar de la aleatorización, los seis pacientes con diabetes fueron asignados al grupo de cirugía periodontal; éste no fue un parámetro de los que se controlaron por la asignación por minimización. La mayoría de los pacientes incluidos fueron varones de alrededor de 50 años de edad. Más del 50% del total eran exfumadores y con nivel de estudios de secundaria o inferior. Por encima del 80% de los pacientes habían sufrido un infarto agudo de miocardio con necesidad de colocación de un stent en alguna de las arterias coronarias menos de un año antes. En el grupo no quirúrgico, este porcentaje fue del 90%. Por último, respecto al IMC, prácticamente todos los pacientes sufrían sobrepeso al inicio del estudio, definido como un IMC superior a 25.

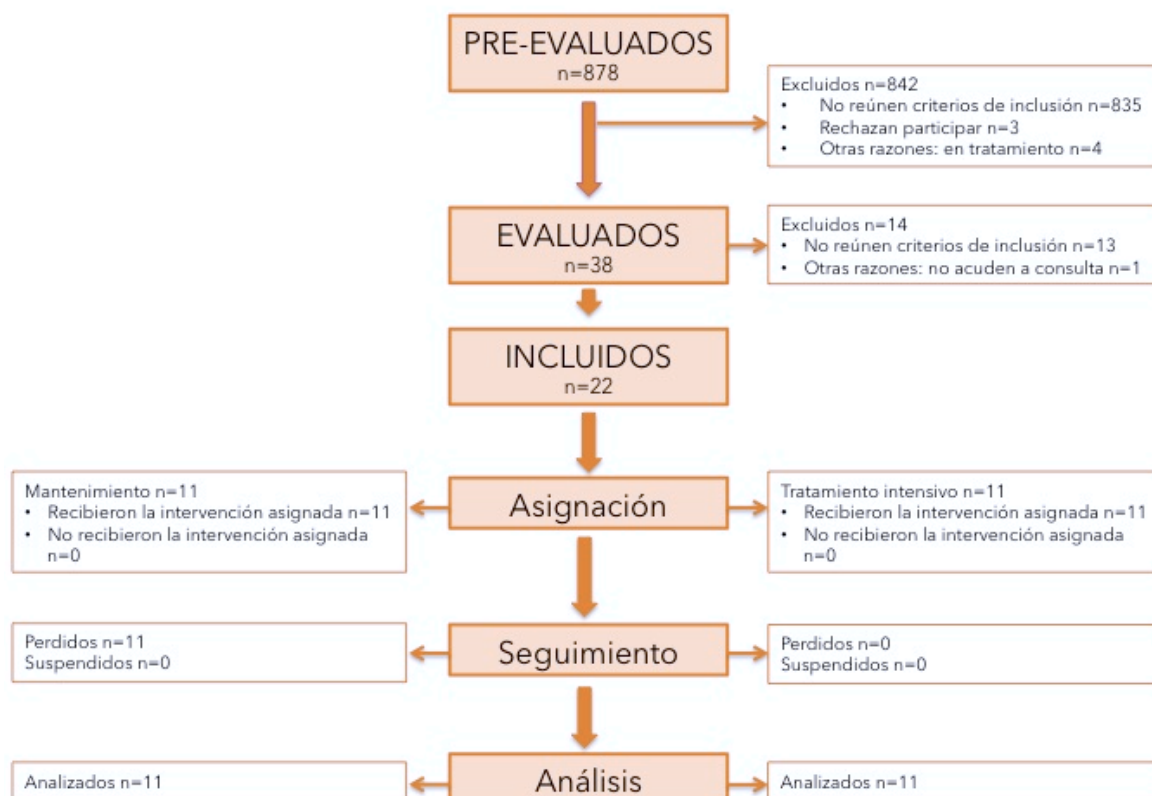


Figura 9: Diagrama CONSORT de los pacientes evaluados, incluidos y analizados.

Tabla 3: Resumen de variables demográficas al inicio del estudio.

		GRUPO		
VARIABLE	Total (n=22)	RAR (n=11; 50,0%)	Cirugía (n=11; 50,0%)	VALOR P *
Edad				
Media	56,32	57,73	54,91	0,300
Mínimo - Máximo	45-68	45-68	48-65	
Sexo (n (% por grupo))				
Mujer	20 (90,91)	10 (90,91)	10 (90,91)	1,000
Hombre	2 (9,09)	1 (9,09)	1 (9,09)	
Consumo de tabaco (n (% por grupo))				
Nunca ha fumado	4 (18,18)	2 (18,18)	2 (18,18)	0,054

Anterior (< 10 cigarrillos/día)	4 (18,18)	4 (36,36)	0 (0,00)	
Anterior (>10 cigarrillos/día)	11 (50,00)	3 (27,27)	8 (72,73)	
Actual (<10 cigarrillos/día)	3 (13,64)	2 (18,18)	1 (9,09)	
Nivel de estudios (n (% por grupo))				
Menos de bachillerato	15 (68,18)	10 (90,91)	5 (45,45)	0,069
Bachillerato	6 (27,27)	1 (9,09)	5 (45,45)	
Más de bachillerato	1 (4,55)	0 (0,0)	1 (9,09)	
Diabetes (n (% por grupo))				
No	16 (72,73)	11 (100,0)	5 (45,45)	0,004
Si	6 (27,27)	0 (0,0)	6 (54,55)	
Tipo de evento (n (% por grupo))				
Infarto agudo de miocardio	3 (13,64)	1 (9,09)	2 (18,18)	0,459
Infarto agudo de miocardio + stent	18 (81,82)	10 (90,91)	8 (72,73)	
Stent	1 (4,55)	0 (0,00)	1 (9,09)	
Antigüedad del evento en años (media (DE))				
>6 meses - ≤ 1 año	18 (81,82)	10 (90,91)	8 (72,73)	0,121
>1 año - ≤2 años	3 (13,64)	0 (0,00)	3 (27,27)	
>2 años - ≤3 años	1 (4,55)	1 (9,09)	0 (0,00)	
Peso en kg (media (DE))	79,55 (14,50)	75,27 (12,63)	83,82 (15,55)	0,270
Altura en cm (media (DE))	167,32 (8,46)	168,09 (6,91)	166,55 (10,09)	0,898
IMC (media (DE))	28,34 (4,25)	26,57 (3,99)	30,10 (3,89)	0,056

*: Valor P para la comparación entre grupos: prueba U de Mann-Whitney para variables continuas y Chi-cuadrado para variables categóricas.

5.B. ESTADO INICIAL Y EVOLUCIÓN CLÍNICA

Los datos que se describirán a continuación están detallados en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Resumen de datos y comparación estadística de los datos clínicos periodontales. Todos los valores se presentan como media (DE).

	Total	RAR	Cirugía	Valor P*
FGM (mm)				
Inicio	-1,31 (1,03)	-1,19 (1,28)	-1,43 (0,73)	0,243
3 meses	-1,61 (1,16)	-1,24 (1,26)	-2,02 (0,93)	0,085
6 meses	-1,93 (1,08)	-1,50 (1,20)	-2,41 (0,72)	0,035
Valor P**	0,006 ***	0,332	0,005 ***	
PD (mm)				
Inicio	4,25 (0,76)	3,89 (0,81)	4,61 (0,51)	0,034
3 meses	2,70 (0,68)	2,72 (0,80)	2,69 (0,57)	0,918
6 meses	2,48 (0,73)	2,32 (0,80)	2,65 (0,65)	0,278
Valor P**	<0,001 ****	<0,001 ****	0,002 ****	
CAL (mm)				
Inicio	5,56 (1,27)	5,08 (1,42)	6,04 (0,92)	0,101
3 meses	4,32 (1,07)	3,96 (1,16)	4,70 (0,86)	0,099
6 meses	4,39 (1,33)	3,78 (1,33)	5,06 (1,01)	0,035
Valor P**	<0,001 ****	0,001 ****	0,002 ****	
Cambios de PD y CAL a lo largo del tiempo (mm)				
Cambio medio de PD desde el inicio a los 3 meses	1,55 (0,64)	1,17 (0,60)	1,97 (0,37)	<0,001
Cambio medio de PD desde el inicio a los 6 meses	1,78 (0,61)	1,59 (0,69)	1,98 (0,46)	0,156
Cambio medio de PD desde los 3 a los 6 meses	0,23 (0,72)	0,45 (0,75)	-0,04 (0,61)	0,203

	Total	RAR	Cirugía	Valor P*
Cambio medio de CAL desde el inicio a los 3 meses	1,29 (0,63)	1,18 (0,67)	1,41 (0,59)	0,468
Cambio medio de CAL desde el inicio a los 6 meses	0,04 (0,97)	0,48 (0,84)	-0,52 (0,86)	0,016
Cambio medio de CAL desde los 3 a los 6 meses	1,16 (1,03)	1,57 (0,79)	0,71 (1,12)	0,053
BOP (% de sitios)				
Inicio	41,25 (26,33)	39,60 (29,65)	42,90 (23,88)	0,519
3 meses	5,61 (8,39)	3,88 (6,65)	7,50 (9,98)	0,512
6 meses	0,78 (2,33)	1,48 (3,12)	0,00 (0,00)	0,497
Valor P **	<0,001 ****	<0,001 ****	<0,001 ****	
PD≥6mm (% de sitios)				
Inicio	19,61 (13,14)	21,32 (15,11)	17,89 (11,30)	0,606
3 meses	4,22 (5,30)	6,40 (6,20)	1,81 (2,73)	0,051
6 meses	1,85 (2,70)	1,97 (3,44)	1,71 (1,73)	0,604
Valor P **	<0,001 ****	<0,001 ****	0,001 ****	
CAL≥5 (% de sitios)				
Inicio	56,58 (27,30)	55,83 (27,66)	57,34 (28,27)	0,898
3 meses	36,94 (26,60)	33,74 (21,90)	40,46 (31,83)	0,863
6 meses	34,28 (28,99)	30,88 (26,75)	38,06 (32,49)	0,905
Valor P**	<0,001 ****	0,002 ****	0,002 ****	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

**.: Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

***: La comparación entre el inicio y los 6 meses fue estadísticamente significativa (p=0.005) aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

**** La comparación entre el inicio y los 3 meses y el inicio y los 6 meses fue estadísticamente significativa aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Al inicio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel medio de inserción clínica comparando los distintos grupos. De hecho, la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas entre grupos en

ningunos de los tiempos de seguimiento, como se puede observar en la **Figura 10**. Concretamente, podemos describir que, al inicio del estudio, más del 50% de los sitios tenían más de 5 mm de CAL, sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p = 0,898$; prueba U de Mann-Whitney). Sin embargo, a los 6 meses, sólo el 30,88 (26,75) % y el 38,06 (32,49) % presentaron esa medida o superior, considerando el grupo de terapia no quirúrgica y quirúrgica, respectivamente. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,905$; prueba U de Mann-Whitney).

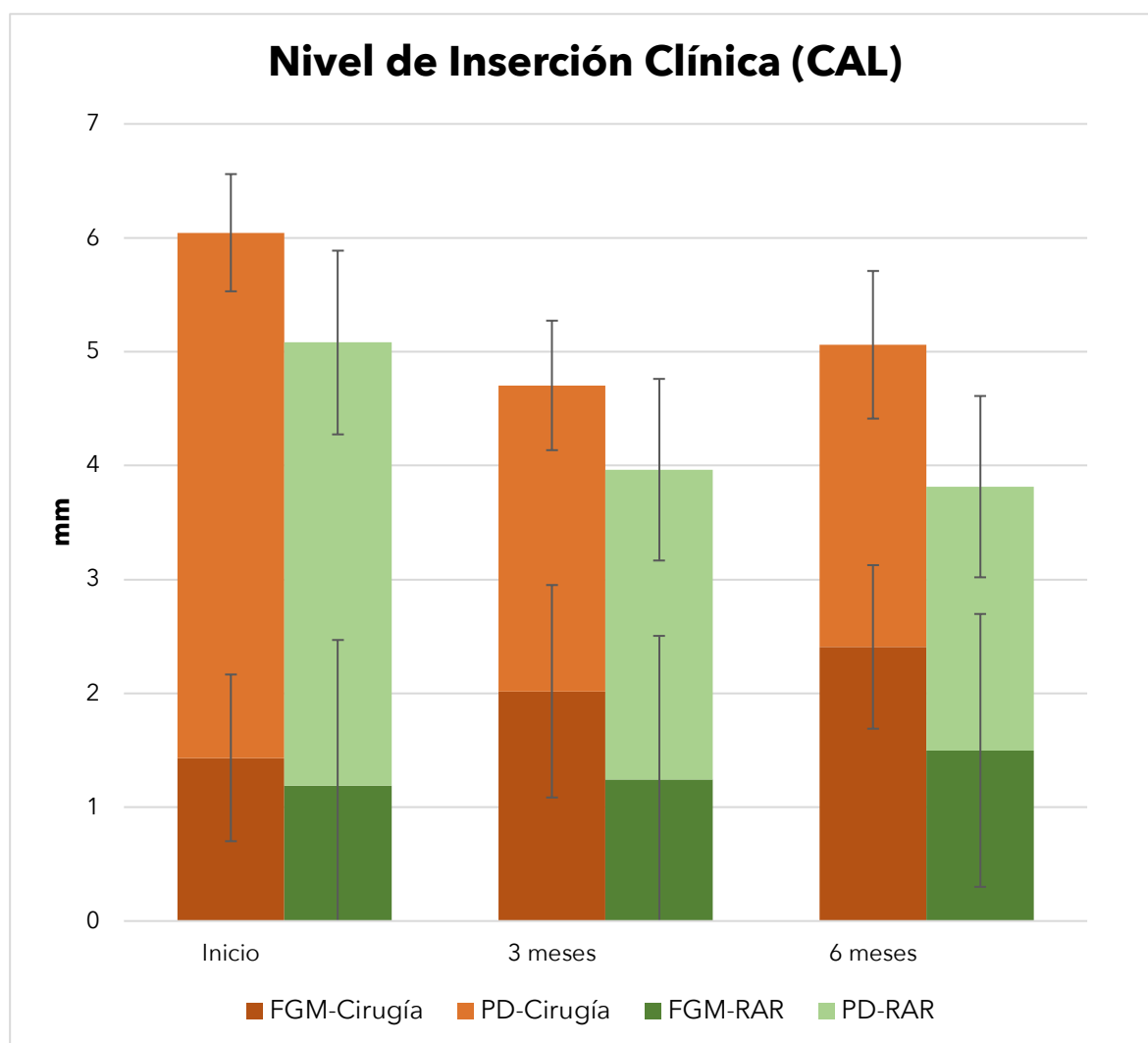


Figura 10: Nivel de inserción clínica como composición en gráfico de columnas apiladas del FGM (color más oscuro) y el PD (color más claro) a lo largo del tiempo en cada grupo de estudio.

Si valoramos el cambio del nivel de inserción clínica a lo largo del tiempo en cada grupo, observamos que fue significativo en todos los casos ($p < 0,001$, test de Friedman). Concretamente, la diferencia por pares se observó en las comparaciones entre los datos basales y los del seguimiento a 3 o 6 meses, pero no entre 3 y 6 meses (corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples). Esta evolución puede observarse mejor en la **Figura 11**.

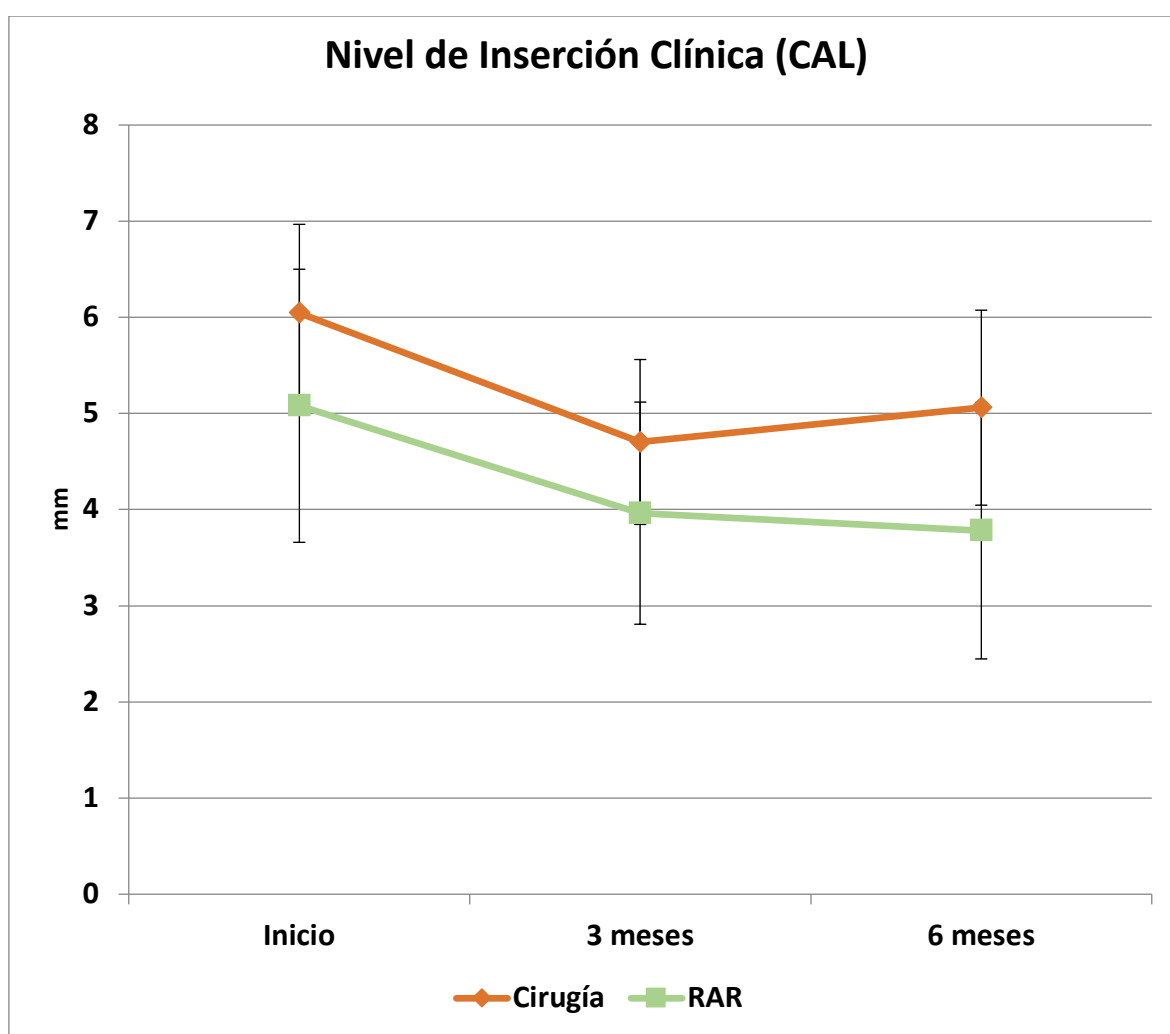


Figura 11: Evolución temporal del nivel de inserción clínica. Como puede observarse, el cambio importante se produce entre el inicio y los 3 meses, pero no entre 3 y 6 meses, como por otra parte podría ser de esperar.

Si analizamos los componentes del CAL, es decir, de forma separada la profundidad de sondaje y el margen gingival, observamos que, en todos los casos, la profundidad de sondaje disminuyó. Al inicio, un 21,32 (15,11) % de los sitios analizados presentaron más de 6 mm en el grupo de terapia no quirúrgica mientras que este valor fue de un 17,89 (11,30) % en el grupo al que se le realizó cirugía periodontal. La diferencia entre ambos no fue estadísticamente significativa ($p = 0,606$, prueba U de Mann-Whitney). En la evaluación a 6 meses, sólo un 1,97 (3,44) % y un 1,71 (1,73) %, respectivamente para los grupos de terapia no quirúrgica y quirúrgica, presentaron sondajes por encima de los 6 mm. Nuevamente, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,604$, prueba U de Mann-Whitney). En valores absolutos, se pasó de una profundidad de sondaje media de 3,89 (0,81) mm en el grupo de terapia no quirúrgica y 4,61 (0,51) mm en el grupo de terapia quirúrgica al inicio, a valores medios de 2,32 (0,80) mm y 2,65 (0,65) mm a los 6 meses (**Figura 12**). Aunque las diferencias entre grupos sólo fueron significativas al inicio ($p = 0,034$, prueba U de Mann-Whitney), no lo fueron ni a 3 ni a 6 meses. Al igual que en el caso del CAL, los cambios a lo largo del tiempo fueron significativos ($p < 0,001$, test de Friedman), concretamente entre el inicio y los 3 o 6 meses, pero no entre los 3 y los 6 meses (corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples).

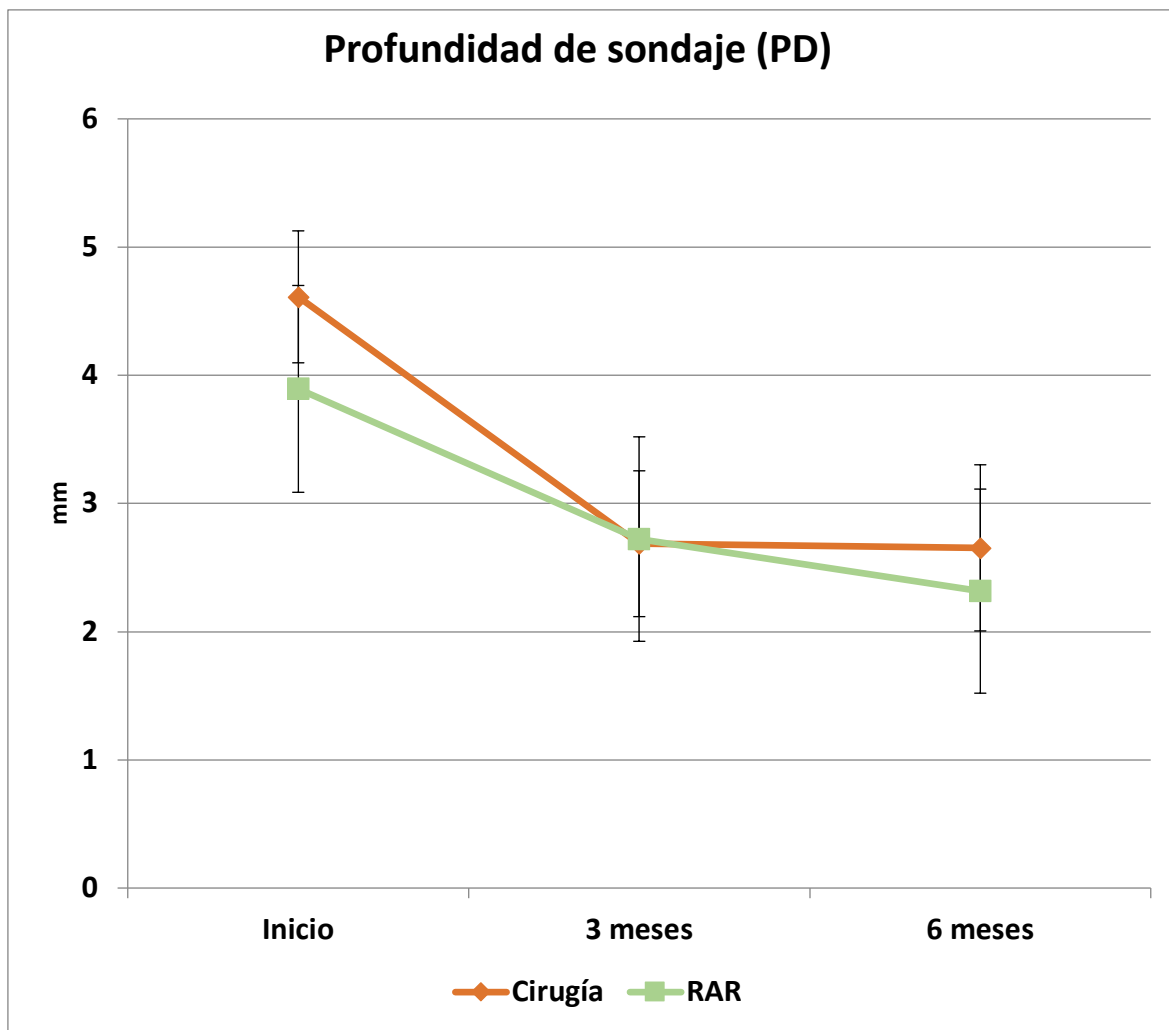


Figura 12: Evolución temporal de la profundidad de sondaje. Como puede observarse, el cambio importante se produce entre el inicio y los 3 meses, pero no entre 3 y 6 meses.

Una descripción muy similar se puede realizar para los niveles del margen gingival. Sin embargo, en este caso las diferencias a lo largo del tiempo se observaron sólo en el grupo de terapia quirúrgica ($p = 0,005$, test de Friedman), concretamente entre el inicio y el seguimiento a 6 meses ($p = 0,005$, corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples), siendo de hecho los niveles estadísticamente diferentes entre grupos sólo en el seguimiento a 6 meses ($p = 0,035$, prueba U de Mann-Whitney) (**Figura 13**). Esto es así precisamente por haber realizado cirugía resectiva en algunos casos.

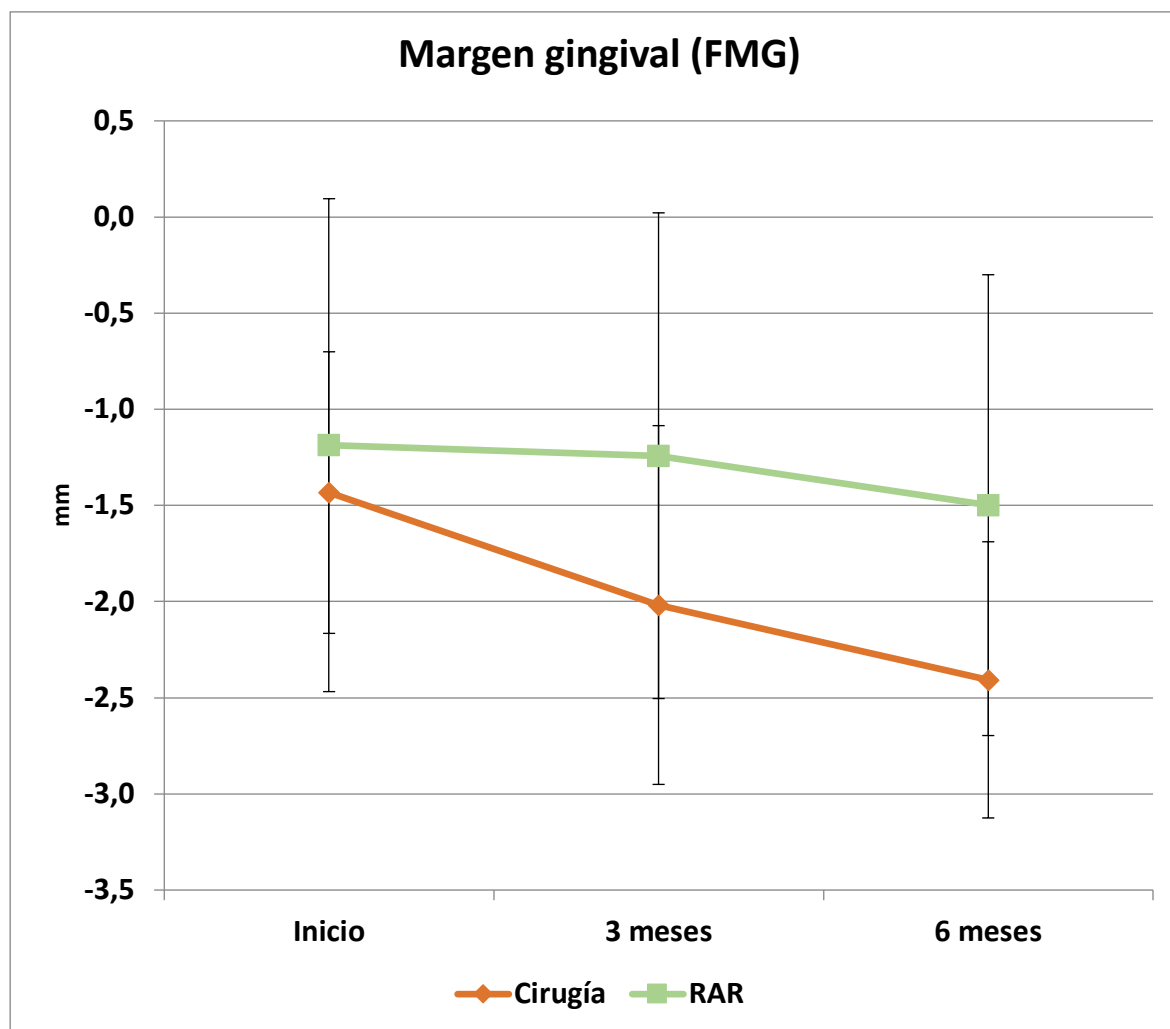


Figura 13: Evolución temporal de la posición del margen gingival. Como puede observarse, el cambio importante se produce sólo en el grupo de terapia quirúrgica, siendo la diferencia significativa sólo entre el inicio y los 6 meses.

Acompañando estos datos, debemos mencionar también los relativos al sangrado al sondaje (BOP). Por un lado, el BOP, en porcentaje de sitios con sangrado positivo, disminuyeron desde el 39,60 (29,65) % en el grupo de terapia no quirúrgica al inicio del estudio hasta el 1,48 (3,12) % a los 6 meses. En el grupo de terapia quirúrgica, la reducción fue desde el 42,90 (23,88) % al inicio del estudio al 0,00 (0,00) % a los 6 meses (**Figura 14**). Nuevamente, no se detectaron diferencias entre grupos (prueba U de Mann-Whitney), pero sí intra-grupos a lo

largo del tiempo (test de Friedman), concretamente entre el inicio y los 3 o 6 meses, pero no entre 3 y 6 meses (corrección de Bonferroni).

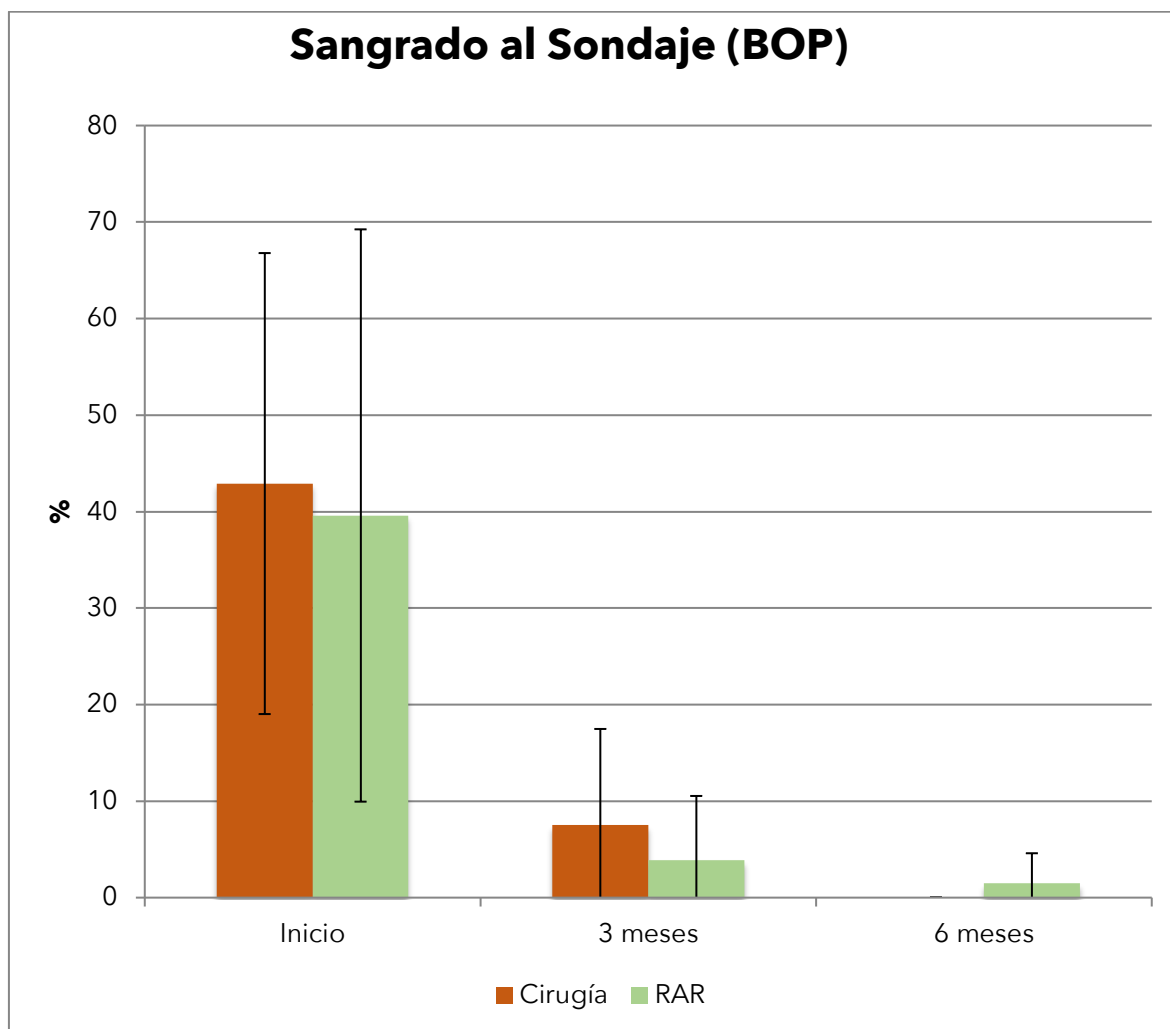


Figura 14: Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje en cada grupo y tiempo de seguimiento.

Del mismo modo, debemos valorar la evolución de los índices de placa (**Figura 15**) y gingival (**Figura 16**). En ambos grupos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos, pero sí lo fueron a lo largo del tiempo.

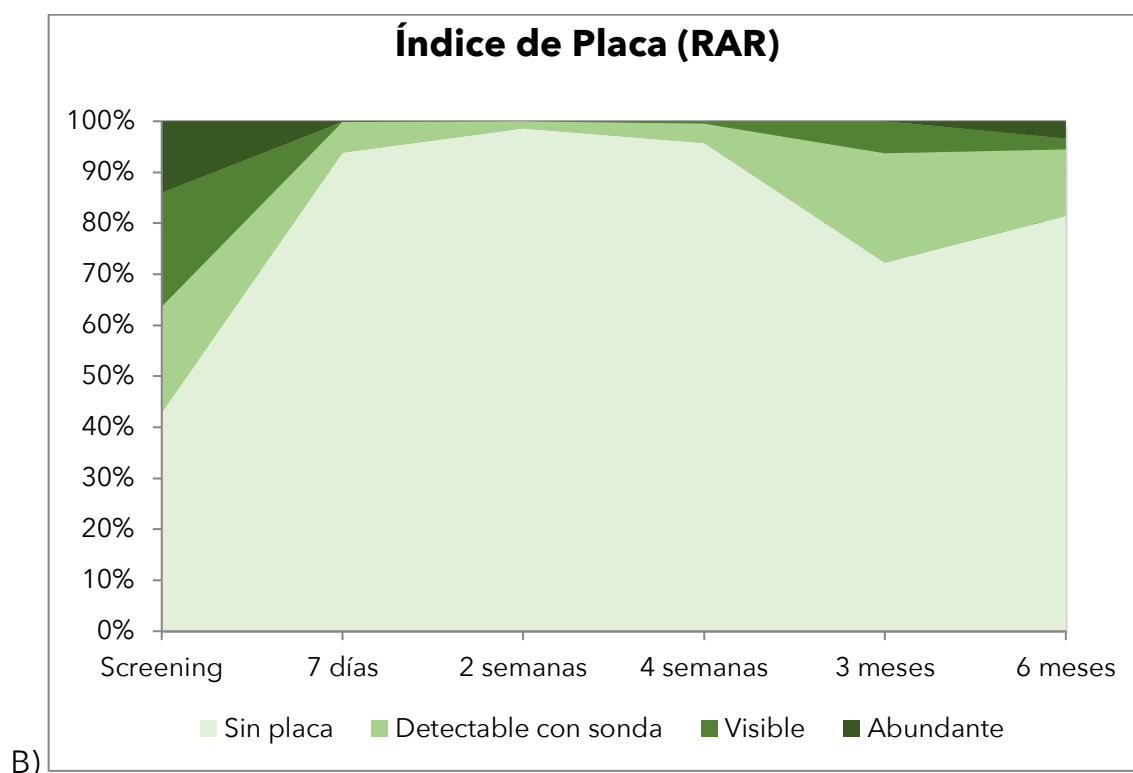
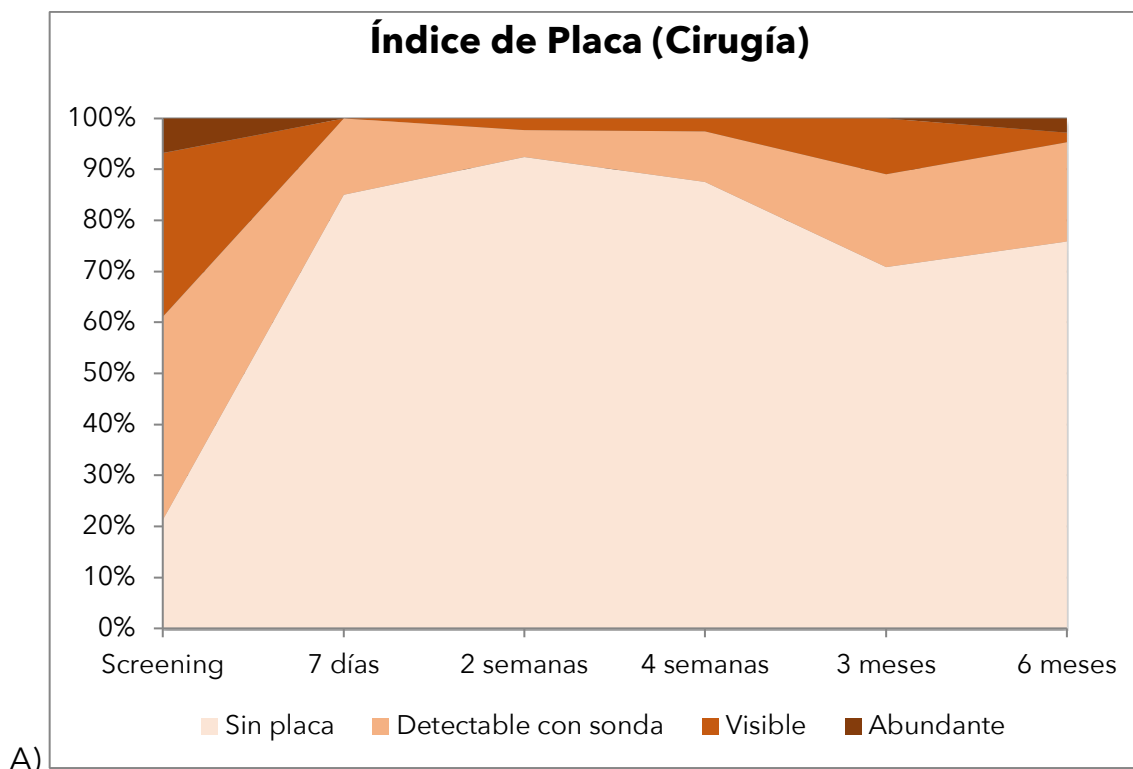


Figura 15: Representación gráfica del índice de placa A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo al que se aplicó terapia no quirúrgica.

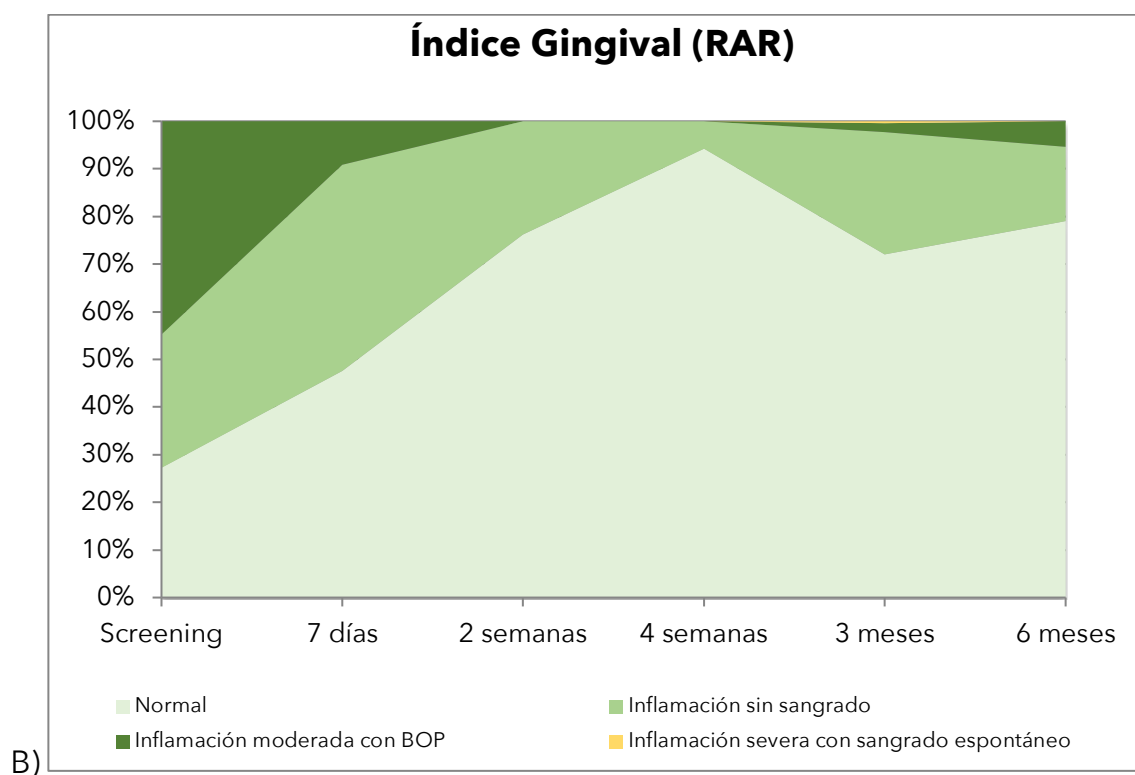
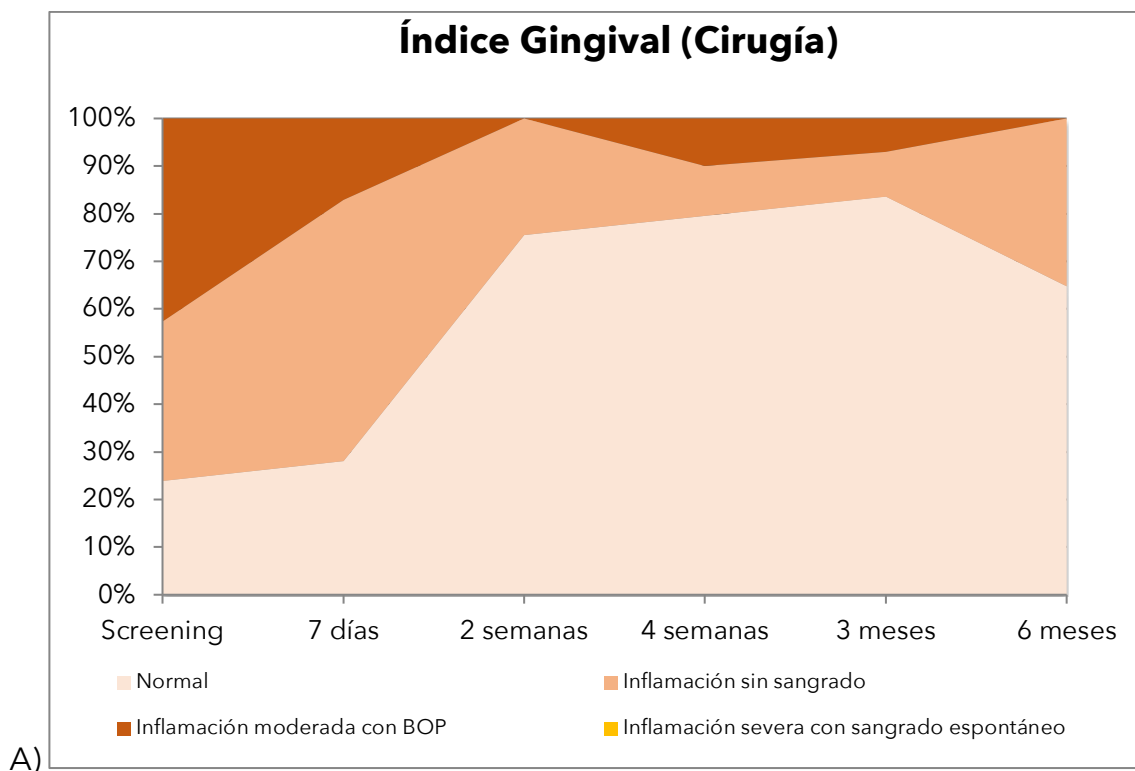


Figura 16: Representación gráfica del índice gingival A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo al que se aplicó terapia no quirúrgica.

En cuanto al dolor medido en mm, en ningún caso pudo ser considerado alto, siendo ya de alrededor de 0 a las 4 semanas (**Tabla 5** y **Figura 17**).

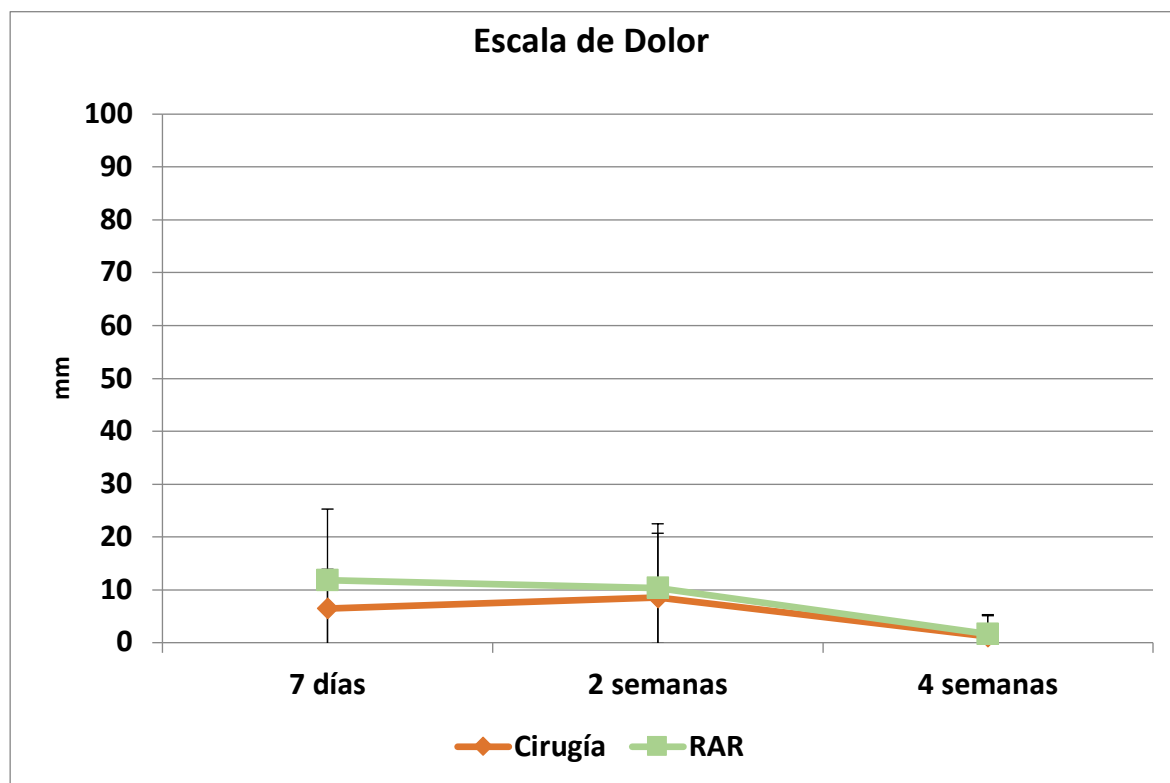


Figura 17: Evolución del dolor medido en escala de 0 a 100.

Tabla 5: Escala de dolor medido de 0-100 mm combinado o por grupo a lo largo del tiempo. Todos los valores se presentan como media (DE).

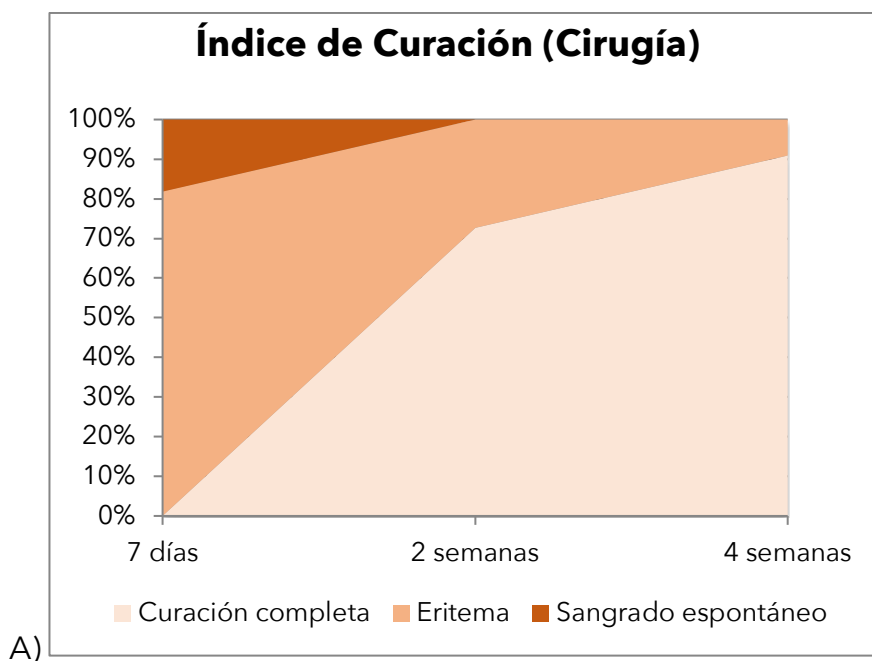
	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
7 días	9,14 (10,96)	11,82 (13,47)	6,45 (7,43)	0,401
2 semanas	9,41 (12,05)	10,27 (10,43)	8,55 (13,95)	0,365
4 semanas	1,41 (3,71)	1,64 (3,67)	1,18 (3,92)	0,797
Valor P **	0,035 ***	0,237	0,131	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

***: Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

***: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la comparación por pares aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Por último, respecto a los parámetros clínicos periodontales, debemos mencionar el índice de curación evaluado tras la intervención. En ambos casos, la evolución fue positiva, obteniéndose índices de curación completa más pronto en el grupo en el que se realizó la intervención no quirúrgica, como es lógico (**Tabla 6 y Figura 18**).



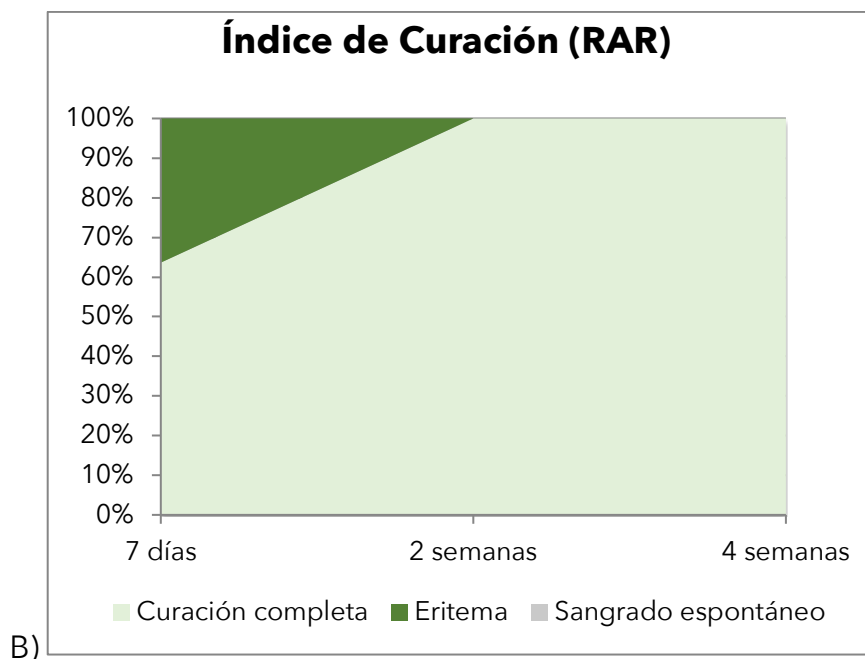


Figura 18: Representación gráfica del índice de curación a lo largo de las 4 primeras semanas A) en el grupo intervenido mediante cirugía y B) en el grupo de intervención no quirúrgica.

Tabla 6: Índice de curación (n (%)) en el conjunto de pacientes o por grupo a lo largo del tiempo

	7 días	2 semanas	4 semanas
Total			
Curación completa	7 (31,82)	19 (86,36)	21 (95,45)
Eritema	13 (59,09)	3 (13,64)	1 (4,55)
Sangrado espontáneo	2 (9,09)	0 (0,00)	0 (0,00)
Grupo de terapia no quirúrgica (RAR)			
Curación completa	7 (63,64)	11 (100,00)	11 (100,00)
Eritema	4 (36,36)	0 (0,00)	0 (0,00)
Sangrado espontáneo	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Grupo de terapia quirúrgica			
Curación completa	0 (0,00)	8 (72,73)	10 (90,91)
Eritema	9 (81,82)	3 (27,27)	1 (9,09)
Sangrado espontáneo	2 (18,18)	0 (0,00)	0 (0,00)
Valor P *	0,004	0,062	0,306

*: Valor P: test de Chi-cuadrado (RAR vs. cirugía).

Respecto a los parámetros sistémicos de presión arterial (**Tabla 7** y **Figura 19**) y glucemia (**Tabla 8** y **Figura 20**), de relevancia cardiovascular, no se observaron diferencias ni a lo largo del tiempo ni entre grupos.

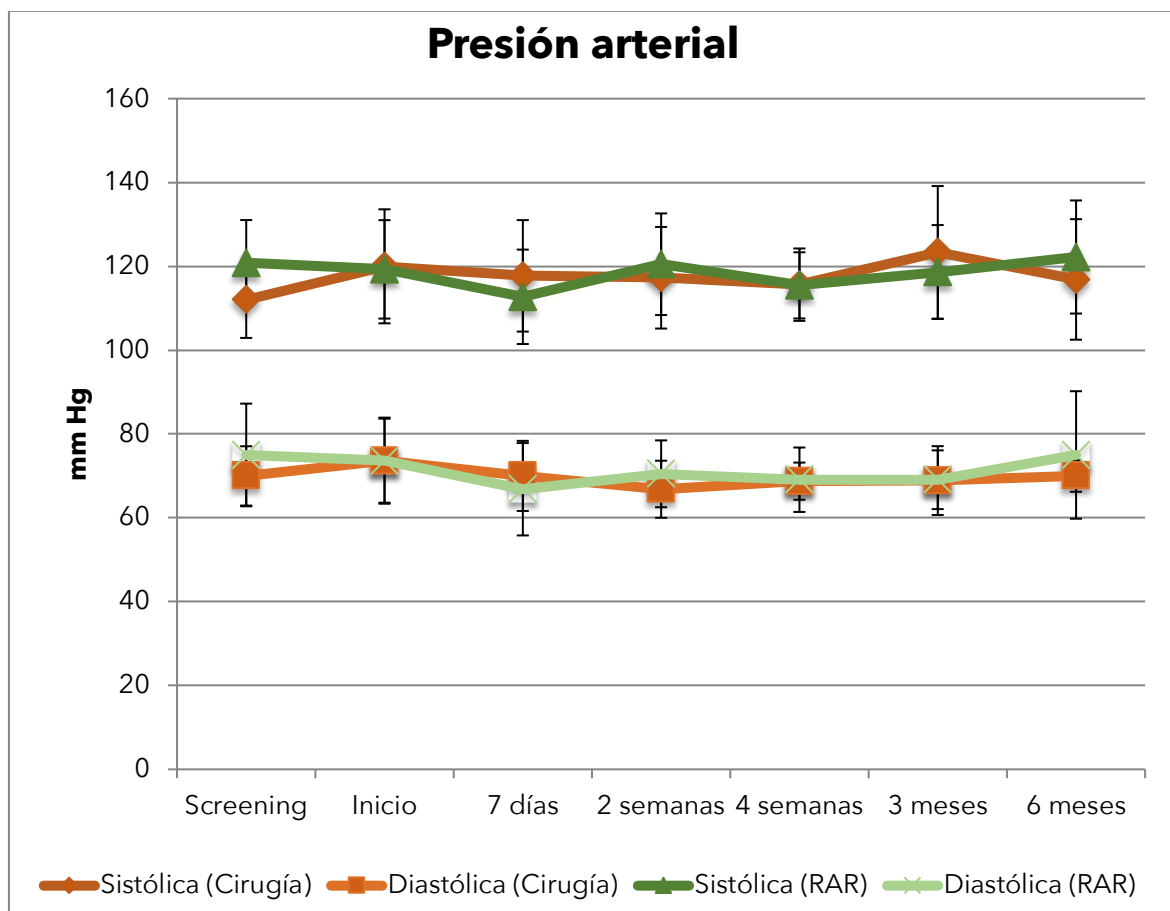


Figura 19: Representación gráfica de las presiones arteriales, tanto sistólicas como diastólicas, en ambos grupos a lo largo del tiempo.

Tabla 7: Presión arterial (mm Hg) a lo largo del tiempo. Los datos se muestran como media (DE).

	Total	RAR	Cirugía	Valor P*
Sistólica				
Inicio	119,64 (12,40)	119,27 (11,74)	120,83 (13,60)	0,562
7 días	115,23 (12,29)	112,73 (11,26)	117,73 (13,30)	0,365

2 semanas	118,81 (11,93)	120,50 (12,12)	117,27 (12,12)	0,468
4 semanas	115,53 (7,97)	115,45 (7,89)	115,63 (8,63)	1,000
3 meses	120,75 (13,31)	118,64 (11,20)	123,33 (15,81)	0,882
6 meses	119,71 (13,75)	122,22 (13,49)	116,88 (14,38)	0,139
Valor P**	0,837	0,341	0,530	
Diastólica				
Inicio	73,64 (9,90)	73,64 (10,27)	73,64 (10,02)	0,949
7 días	68,41 (9,68)	66,82 (11,02)	70,00 (8,37)	0,699
2 semanas	68,57 (7,44)	70,50 (7,98)	66,82 (6,81)	0,387
4 semanas	68,95 (6,36)	69,09 (7,69)	68,75 (4,43)	1,000
3 meses	69,00 (7,36)	69,09 (7,01)	68,89 (8,21)	1,000
6 meses	72,65 (11,34)	75,00 (15,21)	70,00 (3,78)	0,481
Valor P**	0,641	0,994	0,254	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

***: Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

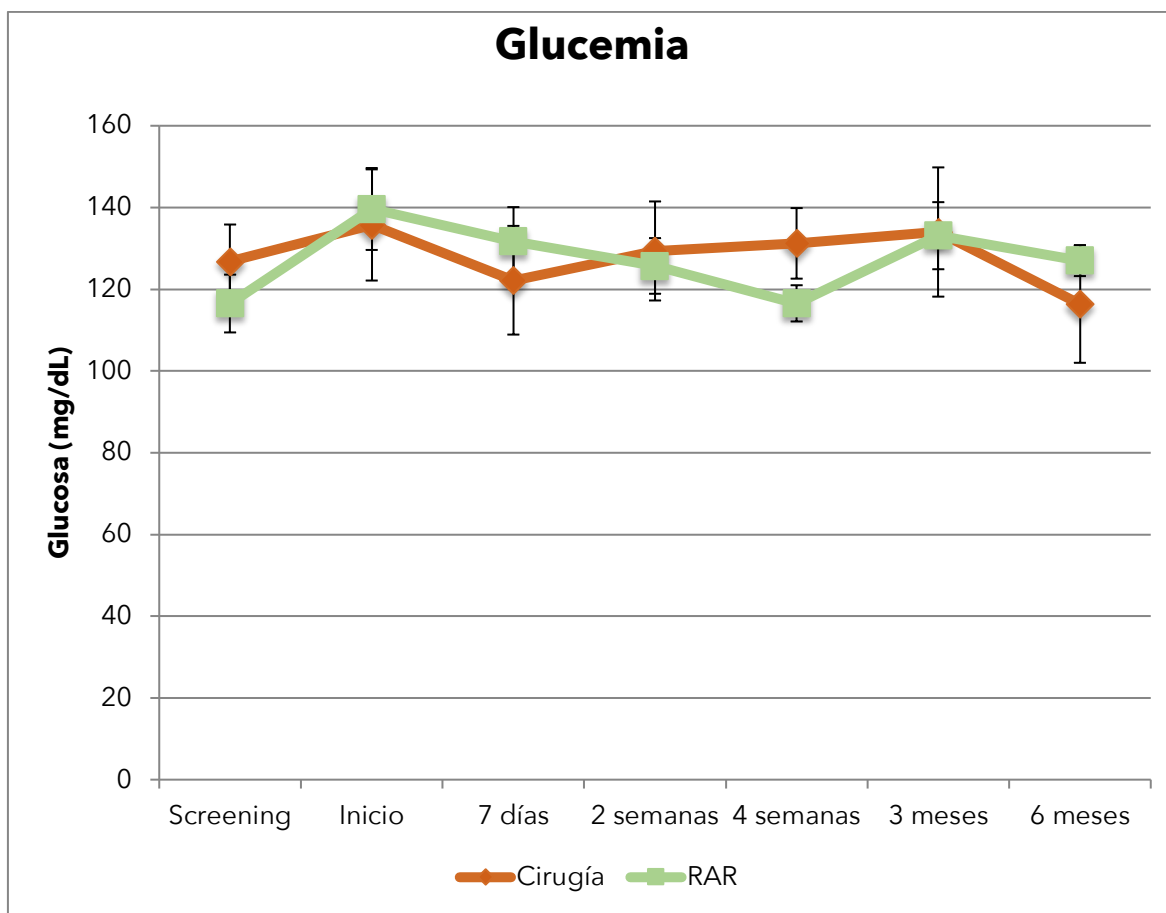


Figura 20: Valores de glucemia a lo largo del tiempo en los grupos de estudio.

Tabla 8: Glucemia (mg/dl) a lo largo del tiempo. Los datos se muestran como media (DE).

	Total	RAR	Cirugía	Valor P*
Inicio	137,68 (53,38)	139,64 (50,21)	135,73 (58,77)	0,898
7 días	127,19 (29,33)	131,73 (34,18)	122,20 (23,68)	0,557
2 semanas	127,62 (50,69)	125,70 (54,52)	129,36 (49,55)	0,654
4 semanas	123,15 (29,11)	116,55 (22,85)	131,22 (35,01)	0,295
3 meses	133,55 (48,10)	133,10 (56,60)	134,00 (43,17)	0,631
6 meses	122,00 (44,68)	127,00 (55,43)	116,38 (31,35)	0,888
Valor P **	0,737	0,700	0,845	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

**: Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

5.C. MARCADORES ANALIZADOS EN FLUIDO CREVICULAR Y EN SUERO

5.C.1. Marcadores en fluido crevicular

En primer lugar, analizamos los marcadores relevantes de enfermedad periodontal en el fluido crevicular. Concretamente, evaluamos la proteína C reactiva (**Figura 21**), interferón gamma (IFN- γ) (**Figura 22**), interleuquina 1-beta (IL-1 β) (**Figura 23**), interleuquina 10 (IL-10) (**Figura 24**), proteína inflamatoria de macrófagos 1-alpha (MIP-1 α) (**Figura 25**), periostin (**Figura 26**) y factor de necrosis tumoral - alpha (TNF- α) (**Figura 27**). Los datos específicos también están expuestos en la **Tabla 9**. Respecto a estos niveles, lo primero a considerar es que ninguno de los indicadores biológicos del proceso inflamatorio, incluyendo las diversas citoquinas y quimioquinas analizadas, demostró diferencias estadísticamente significativas, ni en la comparación por grupos ni en la comparación por tiempos. Sí hubo diferencias en los niveles de periostin a lo largo del tiempo en los pacientes que se sometieron a terapia quirúrgica ($p = 0,019$, test de Friedman), concretamente en la comparación entre los niveles al inicio y a las 2 semanas ($p = 0,005$, corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples). Además, tanto a 7 días como a 2 y 4 semanas también hubo diferencias significativas en la comparación entre grupos ($p = 0,010$, $p = 0,007$ y $p < 0,001$; prueba U de Mann-Whitney a 7 días, 2 y 4 semanas, respectivamente).

CRP en Fluido Crevicular

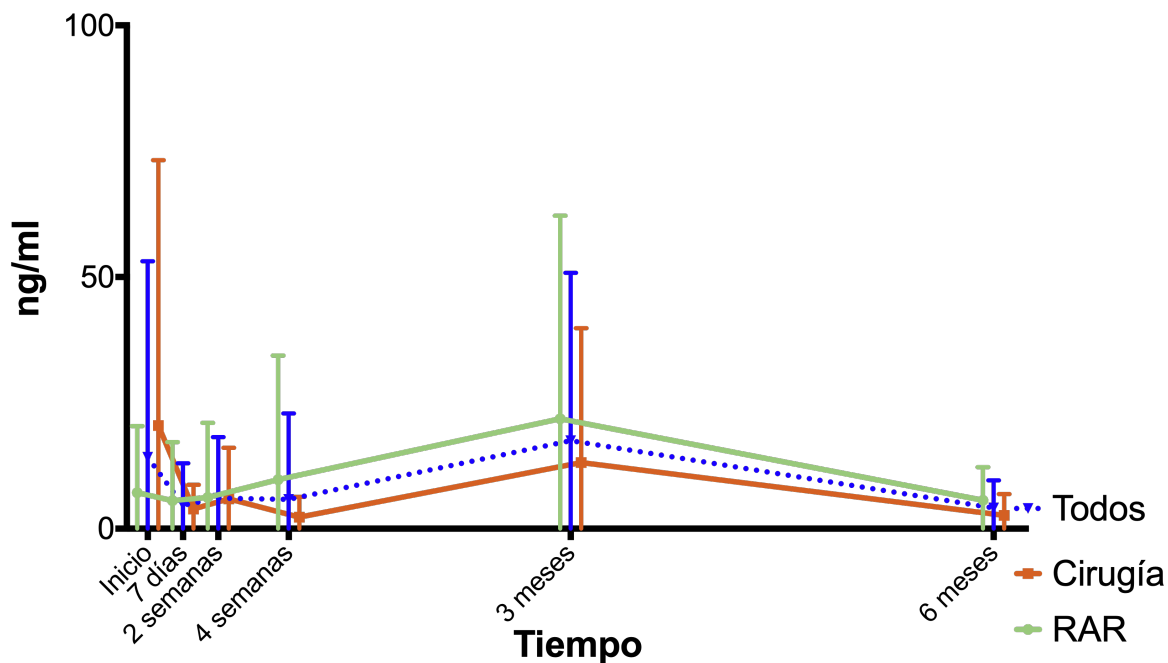


Figura 21: Niveles de CRP en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

IFN-γ en Fluido Crevicular

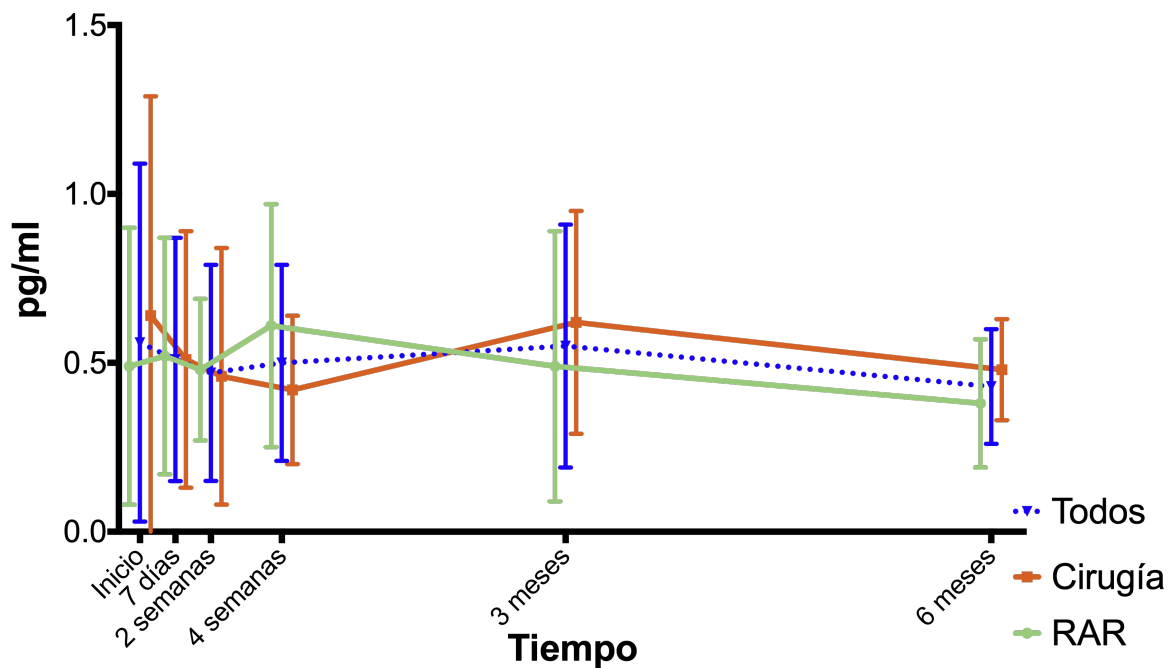


Figura 22: Niveles de IFN-γ en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

IL-1 β en Fluido Crevicular

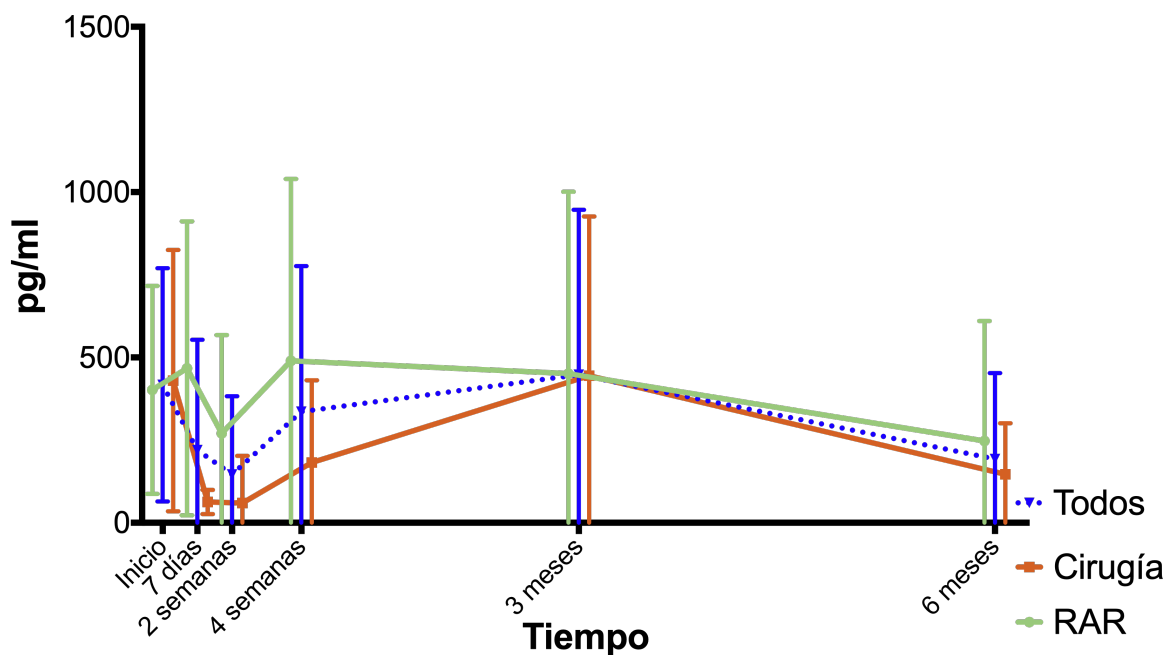


Figura 23: Niveles de IL-1 β en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

IL-10 en Fluido Crevicular

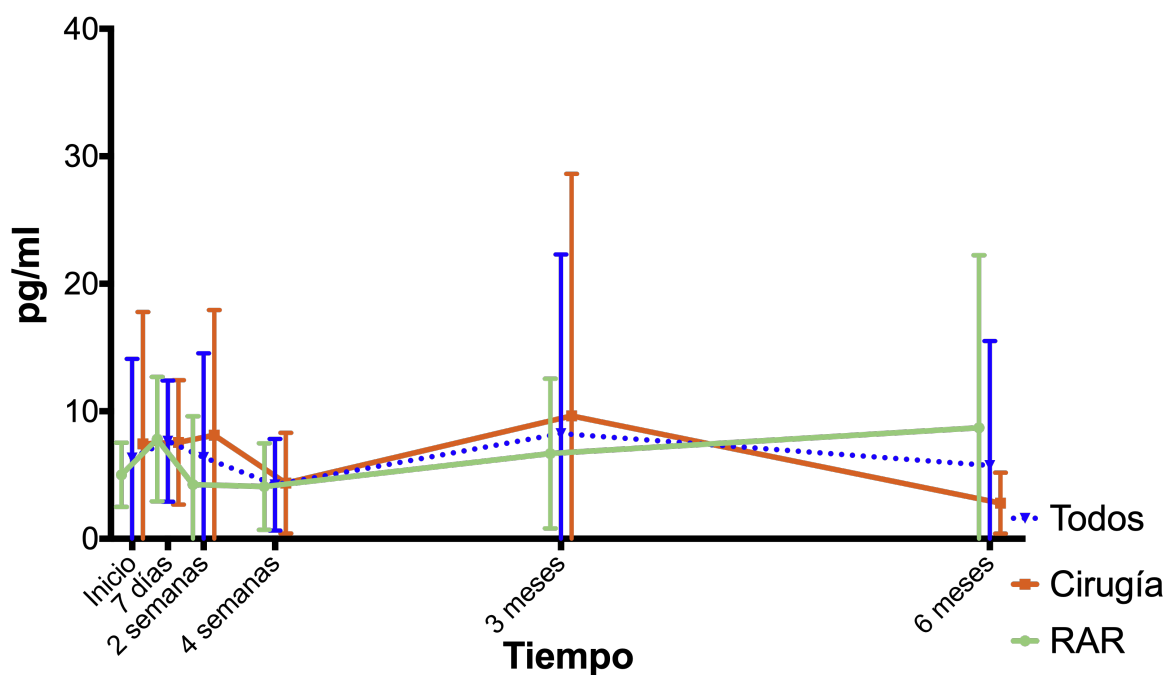


Figura 24: Niveles de IL-10 en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

MIP-1a en Fluido Crevicular

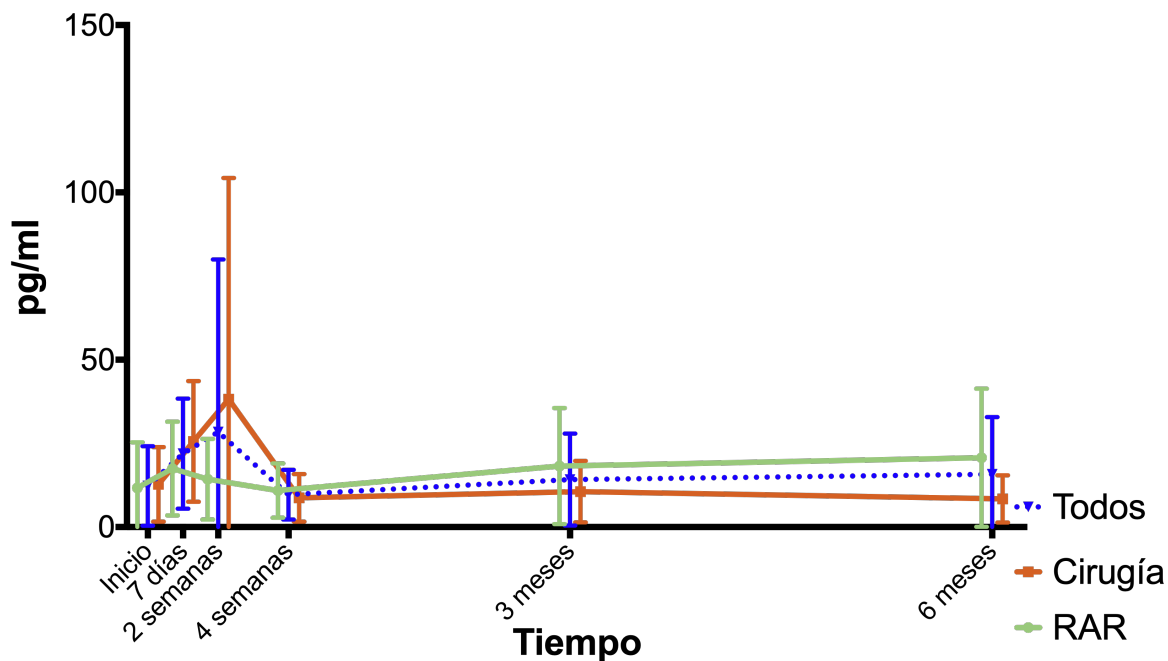


Figura 25: Niveles de MIP-1 α en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

Periostin en Fluido Crevicular

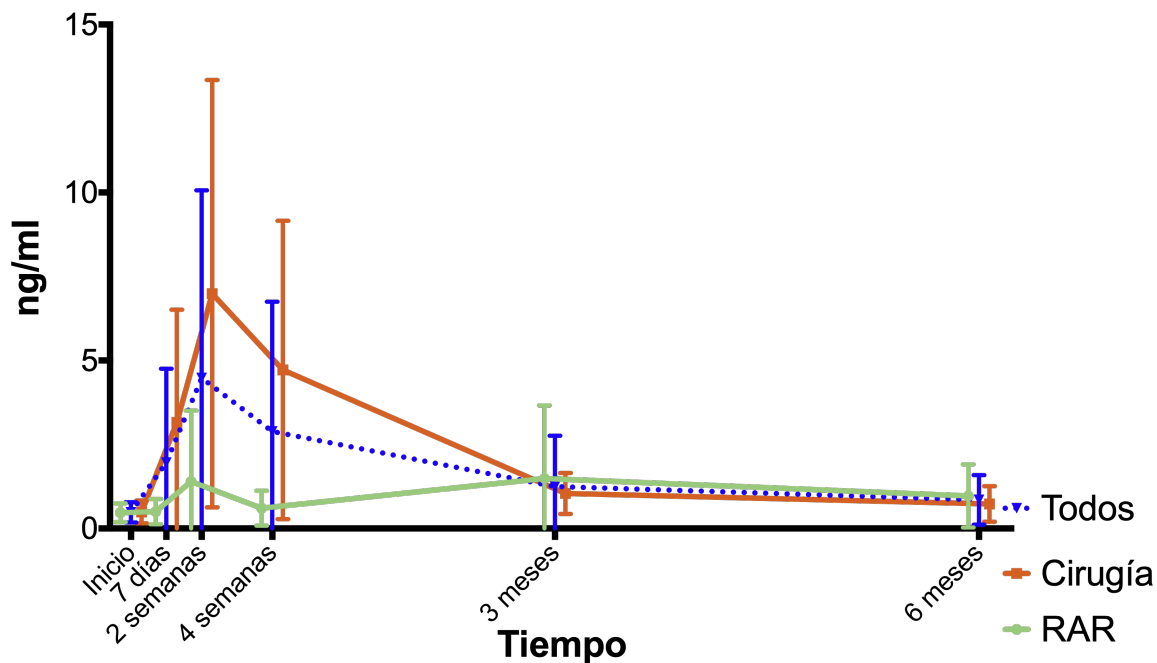


Figura 26: Niveles de periostin en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

TNF- α en Fluido Crevicular

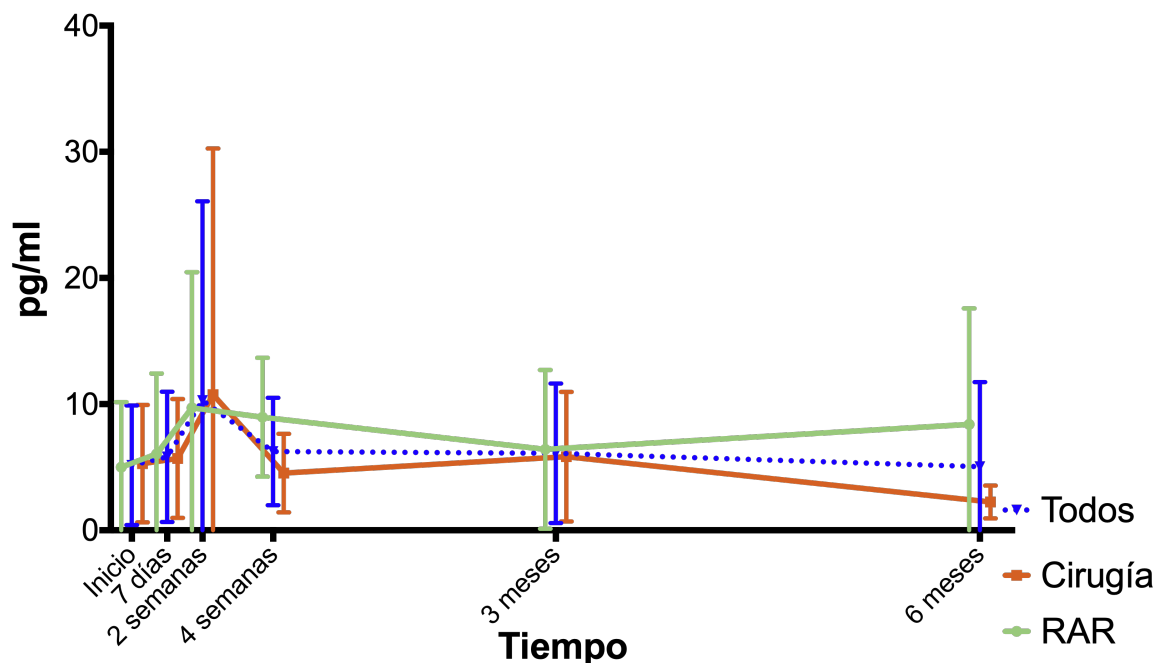


Figura 27: Niveles de TNF- α en fluido crevicular a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

Tabla 9: Marcadores en líquido crevicular gingival, ordenados alfabéticamente. Todos los valores representan la media (DE). Las unidades se especifican para cada molécula.

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
CRP (ng/ml)				
Inicial	14,18 (38,95)	7,17 (13,28)	20,49 (52,76)	0,720
7 días	4,66 (8,4)	5,56 (11,67)	3,92 (4,87)	0,503
2 semanas	6,05 (12,15)	6,2 (14,85)	5,94 (10,19)	0,766
4 semanas	5,82 (17,13)	9,73 (24,66)	2,29 (4,08)	0,315
3 meses	17,47 (33,38)	21,82 (40,38)	13,12 (26,72)	0,721
6 meses	4,13 (5,54)	5,65 (6,64)	2,62 (4,25)	0,589
Valor P **	0,696	0,862	0,285	
IFN-γ (pg/ml)				
Inicial	0,56 (0,53)	0,49 (0,41)	0,64 (0,65)	0,730
7 días	0,51 (0,36)	0,52 (0,35)	0,51 (0,38)	0,813

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
2 semanas	0,47 (0,32)	0,48 (0,21)	0,46 (0,38)	0,713
4 semanas	0,50 (0,29)	0,61 (0,36)	0,42 (0,22)	0,174
3 meses	0,55 (0,36)	0,49 (0,4)	0,62 (0,33)	0,442
6 meses	0,43 (0,17)	0,38 (0,19)	0,48 (0,15)	0,421
Valor P **	0,472	0,416	0,819	
IL-1β (pg/ml)				
Inicial	417,15 (352,48)	401,58 (314,94)	429,90 (395,36)	0,766
7 días	219,88 (334,13)	466,81 (444,63)	62,75 (36,46)	0,044
2 semanas	146,33 (237,3)	270,48 (298,2)	59,42 (142,99)	0,133
4 semanas	336,22 (440,79)	490,03 (550,83)	182,41 (249,74)	0,456
3 meses	447,96 (498,95)	451,36 (550,63)	444,93 (482,27)	0,963
6 meses	192,65 (260,04)	247,64 (363,29)	146,82 (155,28)	1,000
Valor P **	0,020 ***	0,221	0,079	
IL-10 (pg/ml)				
Inicial	6,35 (7,78)	5,02 (2,52)	7,44 (10,35)	0,370
7 días	7,66 (4,75)	7,81 (4,89)	7,56 (4,88)	1,000
2 semanas	6,38 (8,17)	4,25 (5,38)	8,12 (9,82)	0,295
4 semanas	4,24 (3,60)	4,10 (3,40)	4,36 (3,95)	0,780
3 meses	8,25 (14,06)	6,69 (5,87)	9,64 (19,00)	0,606
6 meses	5,75 (9,78)	8,70 (13,55)	2,80 (2,40)	0,485
Valor P **	0,179	0,302	0,409	
MIP-1α (pg/ml)				
Inicial	12,29 (11,91)	11,68 (13,66)	12,74 (11,14)	0,968
7 días	21,93 (16,46)	17,46 (14,00)	25,59 (18,04)	0,331
2 semanas	28,39 (51,61)	14,32 (12,05)	38,23 (66,15)	0,962
4 semanas	9,68 (7,45)	10,89 (8,15)	8,71 (7,13)	0,573
3 meses	14,19 (13,76)	18,24 (17,36)	10,59 (9,16)	0,541
6 meses	15,79 (17,14)	20,72 (20,65)	8,41 (7,04)	0,352
Valor P **	0,484	0,366	0,936	
Periostin (ng/ml)				

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
Inicial	0,48 (0,30)	0,47 (0,28)	0,49 (0,34)	1,000
7 días	1,96 (2,80)	0,50 (0,38)	3,16 (3,36)	0,010
2 semanas	4,48 (5,59)	1,40 (2,12)	6,99 (6,36)	0,007
4 semanas	2,89 (3,87)	0,6 (0,52)	4,72 (4,44)	<0,001
3 meses	1,25 (1,52)	1,49 (2,18)	1,04 (0,61)	0,606
6 meses	0,85 (0,74)	0,97 (0,94)	0,73 (0,53)	0,818
Valor P **	0,605	0,716	0,019 ****	
TNF-α (pg/ml)				
Inicial	5,16 (4,74)	5,00 (5,17)	5,28 (4,66)	0,545
7 días	5,82 (5,16)	6,04 (6,39)	5,69 (4,71)	0,660
2 semanas	10,29 (15,80)	9,71 (10,76)	10,75 (19,51)	0,918
4 semanas	6,24 (4,26)	8,96 (4,71)	4,53 (3,12)	0,127
3 meses	6,11 (5,54)	6,41 (6,30)	5,84 (5,14)	0,963
6 meses	5,04 (6,72)	8,39 (9,21)	2,24 (1,30)	0,429
Valor P **	0,332	0,749	0,235	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

***: Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

***: Comparación estadísticamente significativa entre el inicio y las 2 semanas ($p=0,006$, corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples).

****: No hay comparación significativa por pares aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

5.C.2. Marcadores en suero

Del mismo modo, se realizó la evaluación de los marcadores en suero. Concretamente se evaluaron CRP (**Figura 28**), fibrinógeno (**Figura 29**), IFN- γ (**Figura 30**), IL-1 β (**Figura 31**), IL-6 (**Figura 32**), IL-10 (**Figura 33**), L-selectina (**Figura 34**), MIP-1 α (**Figura 35**), periostin (**Figura 36**), TNF- α (**Figura 37**) y factor de von Willebrand (**Figura 38**). Los datos específicos también están expuestos en formato tabla, en la **Tabla 10**. En este caso, tampoco hubo diferencias entre grupos ni a lo largo del tiempo en ninguno de los marcadores evaluados.

Tampoco se observaron diferencias en los niveles de periostin. De hecho, a pesar de las diferencias observadas transitoriamente en los niveles de periostin en fluido crevicular, por la ausencia de cambios en los niveles a nivel de suero, el análisis a posteriori de la potencia estadística empleando como dato principal el de las diferencias de periostin a nivel sistémico, demostró que se consiguió un nivel bajo. Debemos considerar, eso sí, que se trataba de estudio piloto.

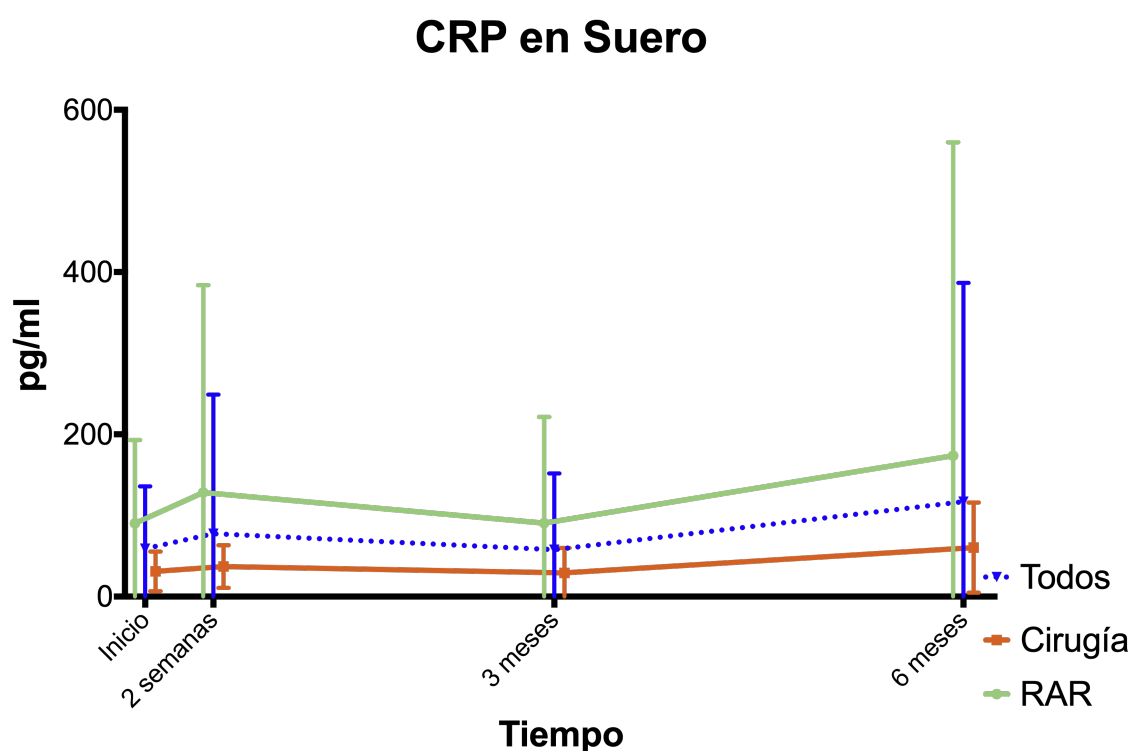


Figura 28: Niveles de CRP en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

Fibrinogeno en Suero

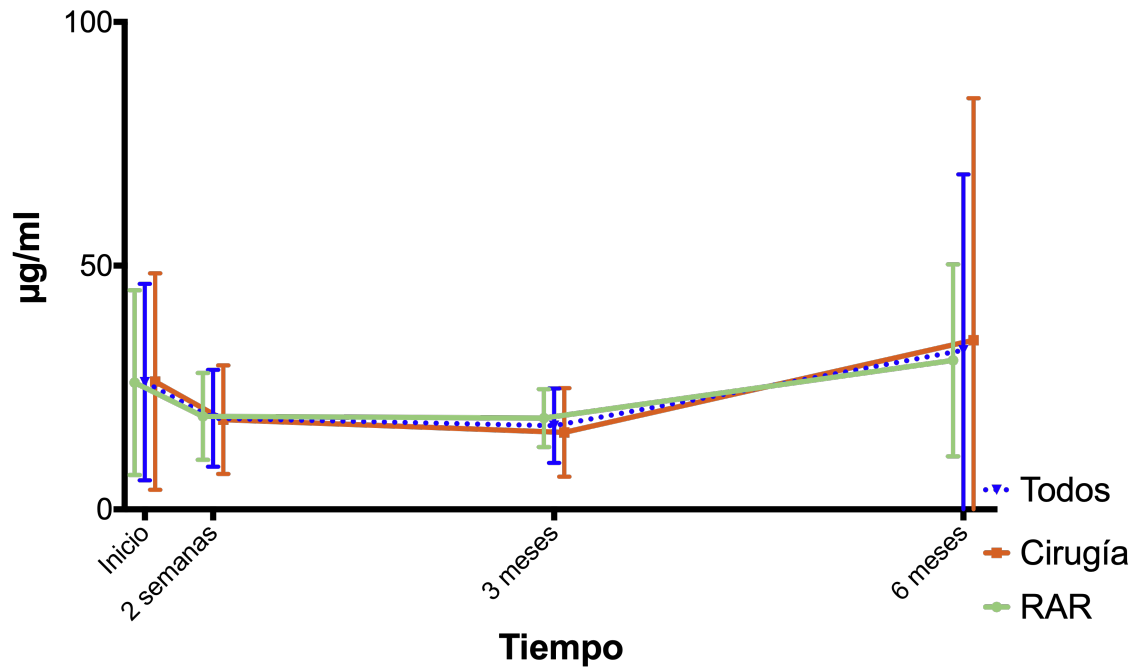


Figura 29: Niveles de fibrinógeno en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

IFN-g en Suero

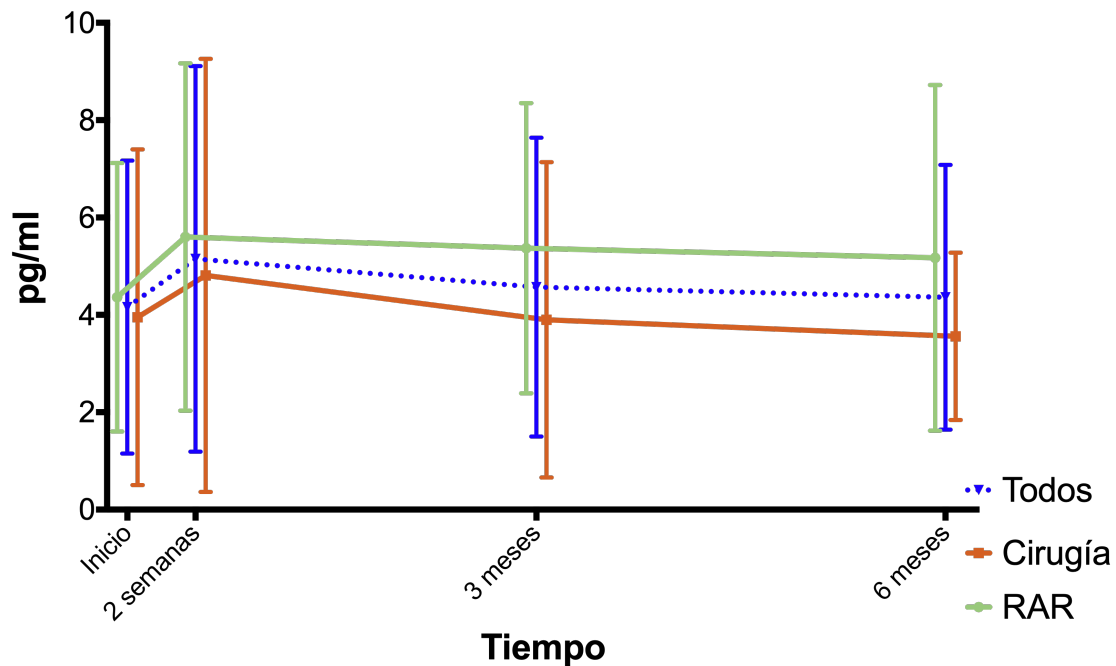


Figura 30: Niveles de IFN-γ en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

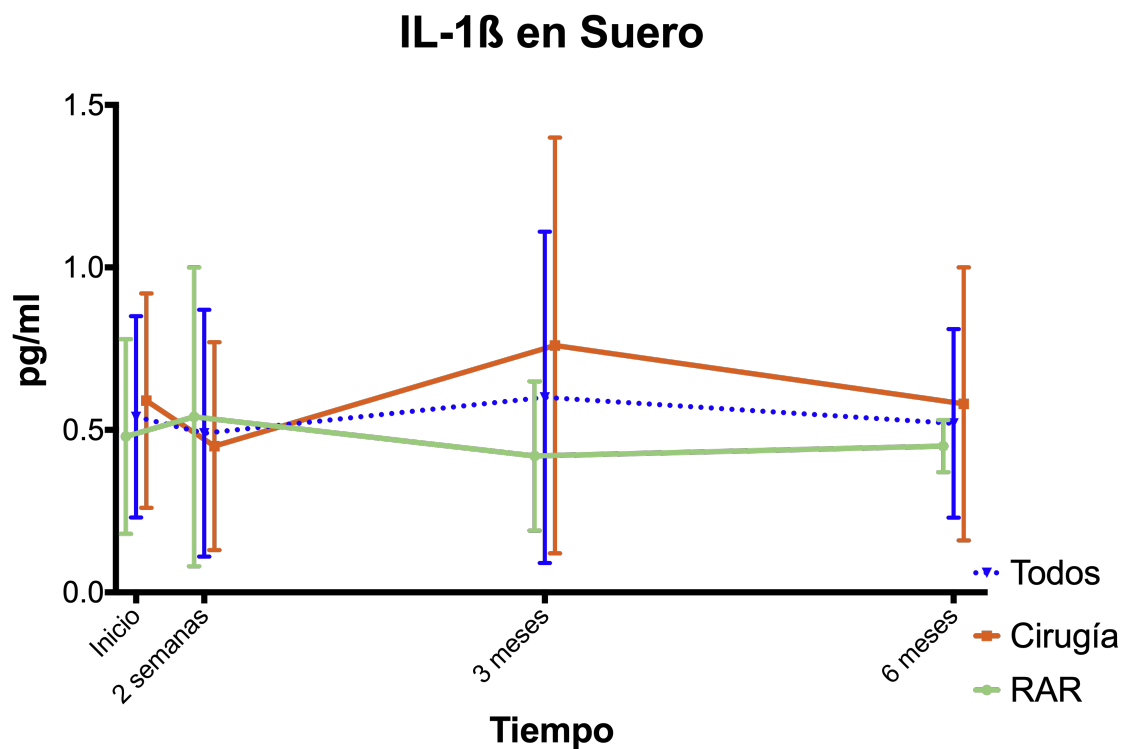


Figura 31: Niveles de IL-1 β en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

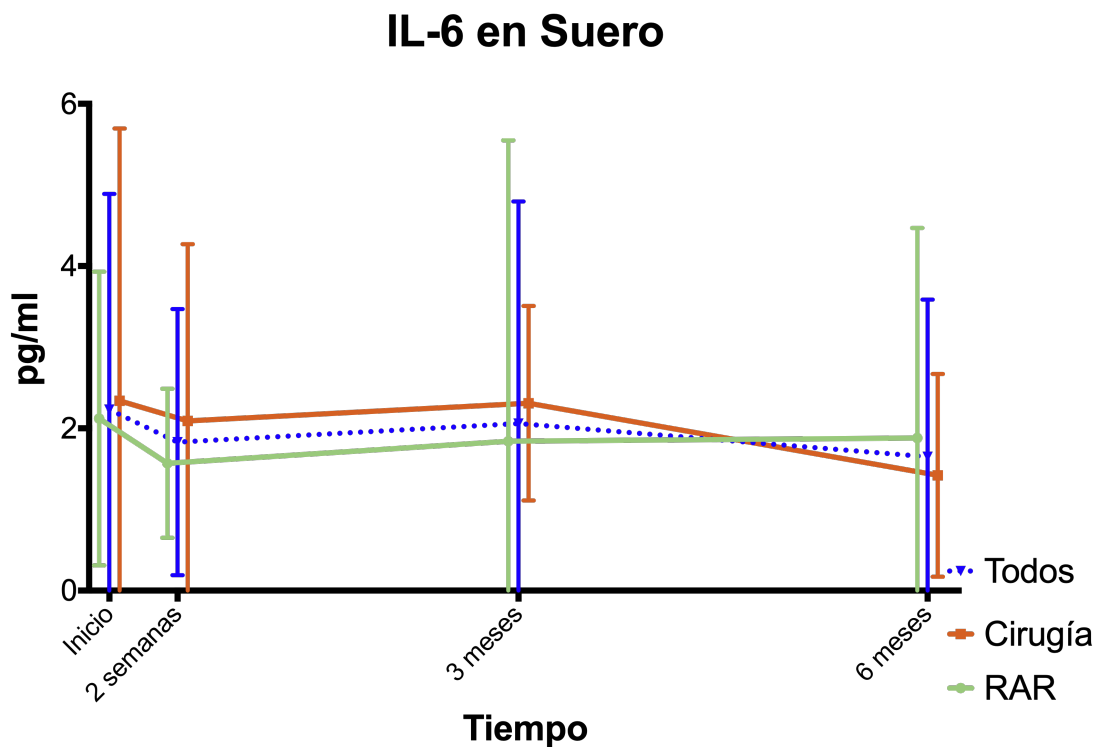


Figura 32: Niveles de IL-6 en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

IL-10 en Suero

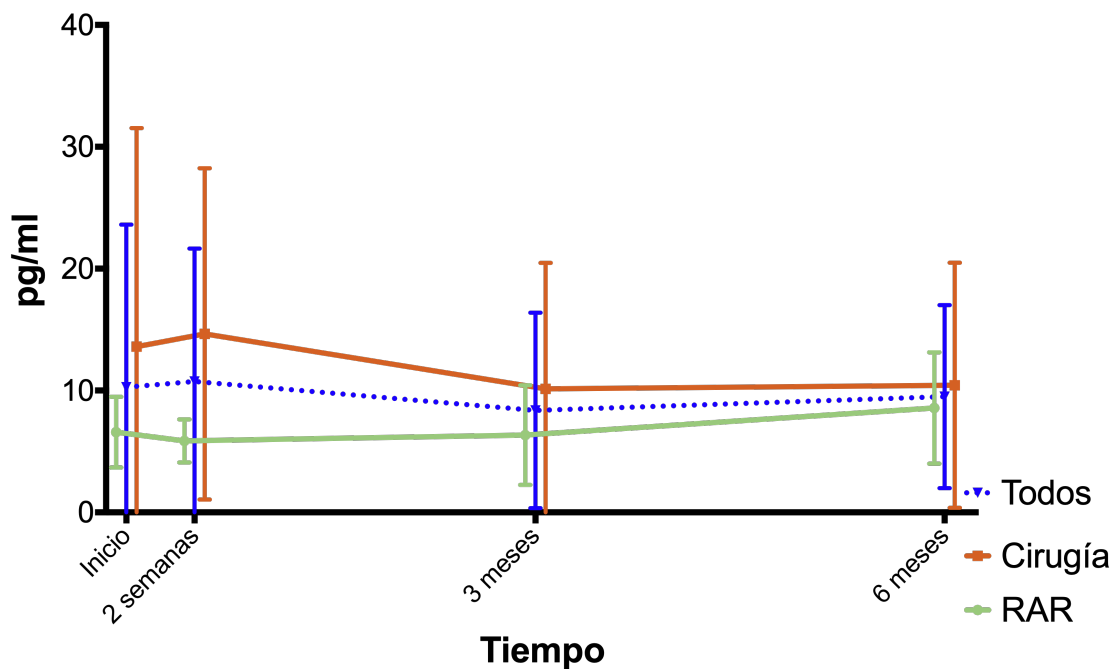


Figura 33: Niveles de IL-10 en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

L-Selectina en Suero

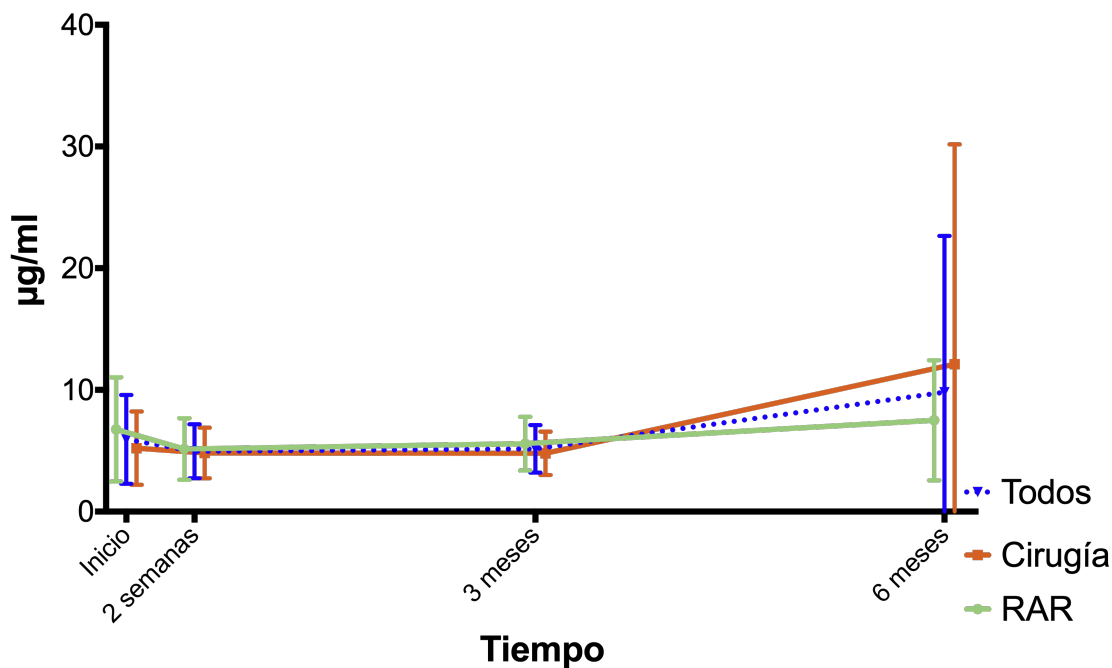


Figura 34: Niveles de L-selectina en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

MIP-1a en Suero

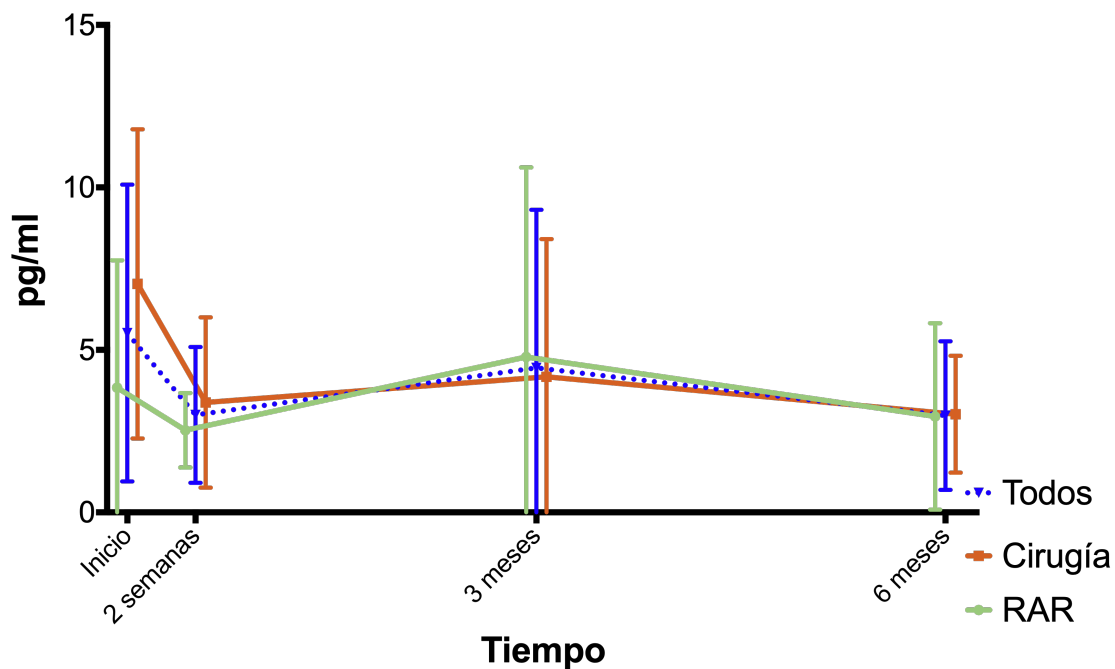


Figura 35: Niveles de MIP-1 α en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea punteada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

Periostin en Suero

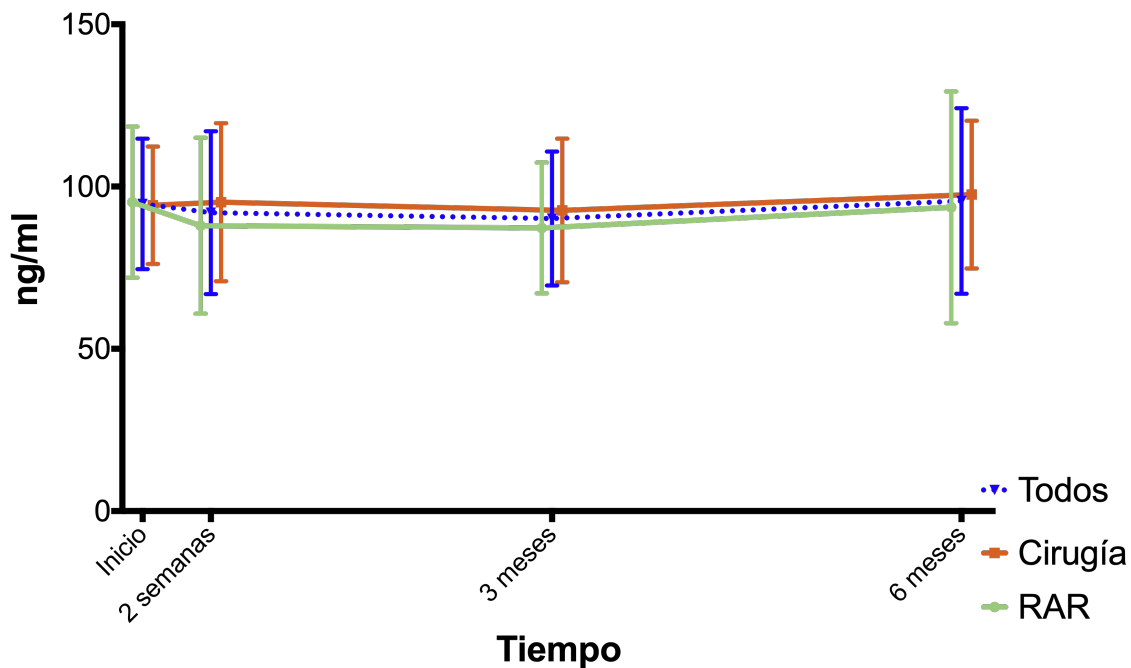


Figura 36: Niveles de periostin en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea punteada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

TNF- α en Suero

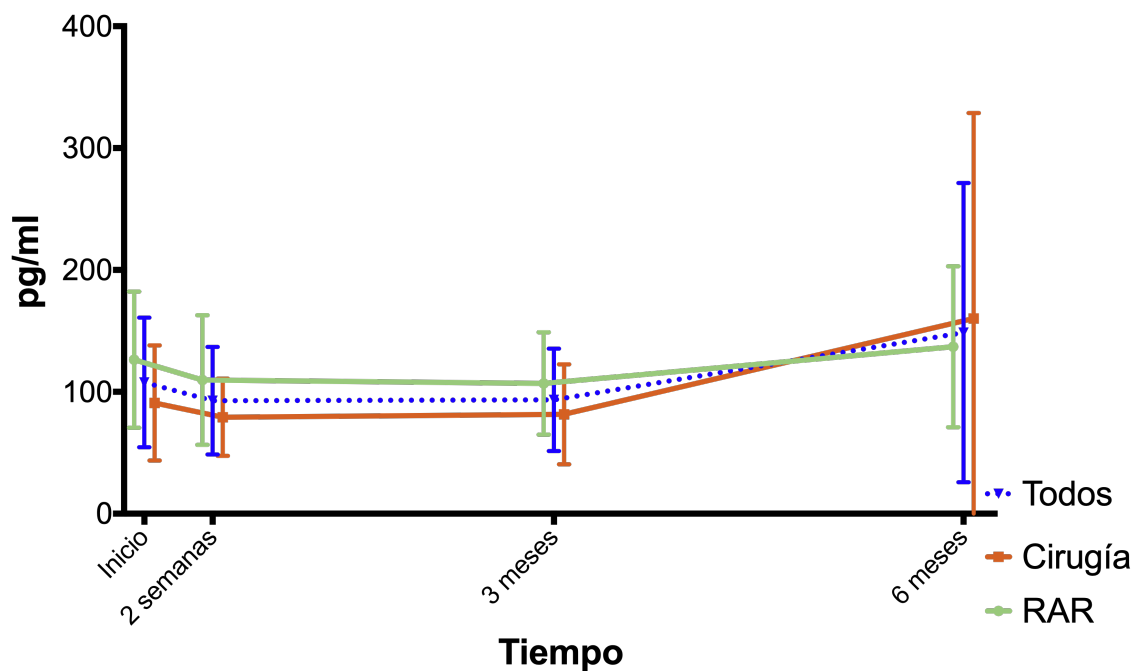


Figura 37: Niveles de TNF- α en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

vWF en Suero

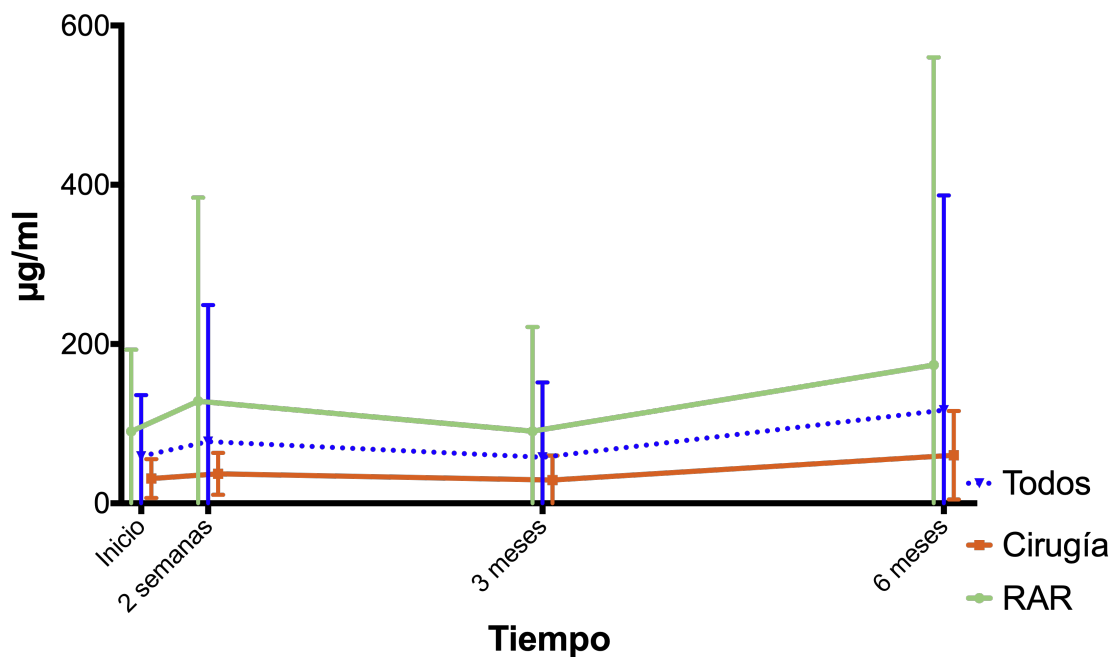


Figura 38: Niveles de factor de von Willebrand en suero a lo largo del tiempo analizado, indicando el conjunto de pacientes (línea puntuada azul) o por separado el grupo de intervención quirúrgica (línea roja) y no quirúrgica (línea verde).

Tabla 10: Marcadores en suero, ordenados alfabéticamente. Todos los valores representan la media (DE). Las unidades se especifican para cada molécula.

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
PCR (µg/ml)				
Inicial	59,09 (76,93)	90,20 (102,82)	31,09 (24,45)	0,447
2 semanas	77,51 (171,64)	128,15 (255,68)	37,00 (26,43)	0,696
3 meses	57,77 (94,08)	90,47 (131,12)	29,16 (30,99)	0,463
6 meses	116,98 (269,91)	173,64 (386,61)	60,31 (55,74)	0,394
Valor P **	0,696	0,960	0,392	
Fibrinógeno (µg/ml)				
Inicial	26,13 (20,16)	26,02 (18,96)	26,23 (22,21)	1,000
2 semanas	18,70 (9,94)	19,09 (8,91)	18,40 (11,16)	0,633
3 meses	17,15 (7,66)	18,73 (5,93)	15,78 (9,09)	0,336
6 meses	32,64 (36,09)	30,57 (19,68)	34,72 (49,68)	0,394
Valor P **	0,241	0,165	0,706	
IFN-γ (pg/ml)				
Inicial	4,16 (3,01)	4,36 (2,76)	3,95 (3,45)	0,535
2 semanas	5,15 (3,96)	5,60 (3,57)	4,81 (4,45)	0,414
3 meses	4,57 (3,07)	5,37 (2,98)	3,90 (3,24)	0,329
6 meses	4,36 (2,72)	5,17 (3,55)	3,56 (1,72)	0,686
Valor P **	0,533	0,801	0,567	
IL-1β (pg/ml)				
Inicial	0,54 (0,31)	0,48 (0,30)	0,59 (0,33)	0,315
2 semanas	0,49 (0,38)	0,54 (0,46)	0,45 (0,32)	0,515
3 meses	0,60 (0,51)	0,42 (0,23)	0,76 (0,64)	0,281
6 meses	0,52 (0,29)	0,45 (0,08)	0,58 (0,42)	0,818
Valor P **	0,543	0,159	0,268	
IL-6 (pg/ml)				
Inicial	2,23 (2,66)	2,12 (1,81)	2,34 (3,36)	0,277
2 semanas	1,83 (1,64)	1,57 (0,92)	2,09 (2,18)	0,959

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
3 meses	2,06 (2,74)	1,84 (3,71)	2,31 (1,20)	0,082
6 meses	1,65 (1,94)	1,88 (2,59)	1,42 (1,25)	0,841
Valor P **	0,392	0,818	0,334	
IL-10 /pg/ml)				
Inicial	10,27 (13,34)	6,58 (2,91)	13,6 (17,95)	0,497
2 semanas	10,74 (10,92)	5,86 (1,77)	14,65 (13,60)	0,043
3 meses	8,36 (8,03)	6,35 (4,09)	10,13 (10,35)	0,397
6 meses	9,5 (7,51)	8,57 (4,57)	10,43 (10,06)	0,699
Valor P **	0,451	0,682	0,025	
L-Selectina (µg/ml)				
Inicial	5,94 (3,66)	6,76 (4,29)	5,21 (3,02)	0,447
2 semanas	4,96 (2,23)	5,14 (2,54)	4,82 (2,08)	0,696
3 meses	5,16 (1,96)	5,58 (2,20)	4,79 (1,79)	0,694
6 meses	9,81 (12,86)	7,50 (4,94)	12,12 (18,08)	0,589
Valor P **	0,266	0,112	0,457	
MIP-1α (pg/ml)				
Inicial	5,52 (4,57)	3,84 (3,93)	7,03 (4,76)	0,095
2 semanas	3,00 (2,09)	2,53 (1,15)	3,38 (2,62)	0,696
3 meses	4,45 (4,87)	4,78 (5,84)	4,17 (4,24)	0,955
6 meses	2,98 (2,29)	2,95 (2,87)	3,02 (1,80)	0,589
Valor P **	0,675	0,852	0,241	
Periostin (ng/ml)				
Inicial	94,66 (20,12)	95,16 (23,3)	94,22 (18,07)	0,661
2 semanas	91,93 (25,11)	87,90 (27,11)	95,16 (24,35)	0,515
3 meses	90,12 (20,66)	87,23 (20,17)	92,66 (22,12)	0,694
6 meses	95,56 (28,62)	93,61 (35,7)	97,5 (22,76)	0,818
Valor P **	0,806	0,691	0,535	
TNF-α (pg/ml)				
Inicial	3,71 (2,03)	2,34 (1,97)	4,81 (1,32)	0,006
2 semanas	3,45 (1,50)	3,07 (1,27)	3,79 (1,67)	0,423

	Total	RAR	Cirugía	Valor P *
3 meses	3,15 (1,71)	2,27 (0,94)	3,93 (1,90)	0,054
6 meses	2,78 (1,69)	2,35 (0,74)	3,14 (2,21)	0,792
Valor P **	0,856	0,308	0,266	
Factor de von Willebrand (µg/ml)				
Inicial	107,7 (53,23)	126,39 (55,84)	90,88 (47,23)	0,182
2 semanas	92,69 (44,09)	109,63 (53,28)	79,15 (31,72)	0,203
3 meses	93,37 (42,06)	106,86 (41,94)	81,56 (41,09)	0,232
6 meses	148,58 (122,8)	136,92 (66,1)	160,25 (168,75)	0,699
Valor P **	0,069	0,127	0,204	

*: Valor P: prueba U de Mann-Whitney (RAR vs. cirugía) a cada tiempo.

** : Valor P: Test de Friedman dentro de cada grupo a lo largo del tiempo.

5.C.3. Correlaciones entre variables

Para finalizar, se realizó un análisis exhaustivo de las posibles correlaciones entre variables clínicas y marcadores bioquímicos, así como entre los propios marcadores bioquímicos, tanto en GCF como en suero, con objeto de determinar posibles relaciones significativas. A pesar de observar correlaciones entre algunas variables en estudio, éstas pueden considerarse como aisladas, sin seguir un patrón o tendencia clara que permita generar una justificación robusta.



DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

Este estudio fue diseñado para evaluar una posible reducción de los niveles de periostin en suero asociada al aumento de periostin en el fluido crevicular gracias a la realización de terapia periodontal. Nuestros resultados previos y la evaluación de la literatura apoyan los planteamientos de este estudio, pero también fuimos conscientes, en la etapa de diseño, de las limitaciones de extrapolación entre estudios. Por tanto, desde el inicio no se propuso periostin como un factor único de esta interacción, ni siquiera como uno de relevancia especialmente elevada por ser ambas enfermedades altamente multifactoriales. Pero sí, en cualquier caso, creímos y mantenemos que la información obtenida añade datos relevantes a la cuestión.

Además, como planteamiento novedoso de este estudio, con respecto a estudios previos que analizaron cómo varían los niveles de periostin en la enfermedad periodontal, fue la inclusión de participantes con enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias de forma concomitante a la presencia de enfermedad periodontal. Hasta donde hemos podido evaluar, sólo un estudio transversal previo ha analizado pacientes con ambas patologías. Sus hallazgos sugieren un papel potencial de periostin en la asociación entre ambas, tras analizar a más de 100 participantes (Rezaei et al. 2021).

Los resultados principales del presente estudio, de modo resumido, demuestran un aumento significativo, aunque de manera transitoria en los niveles locales de periostin en el fluido crevicular. Concretamente, estos niveles aumentan a los 7

días y hasta 4 semanas después del tratamiento quirúrgico de la enfermedad periodontal. Además, de esto pudimos observar una reducción de algunos marcadores asociados con la enfermedad periodontal y aterosclerótica, incluyendo IL-6, MIP-1 α y TNF- α , particularmente en el grupo que recibió cirugía periodontal. Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas.

Los niveles normales de periostin en salud no han sido establecidos. Sí se ha confirmado mediante un reciente meta-análisis que, a pesar de estudios discrepantes puntuales en los que se ha reportado lo contrario (Arslan et al. 2021), los niveles de periostin en fluido crevicular de pacientes con problemas periodontales (gingivitis o periodontitis) son más bajos que en pacientes sanos (Abdolalian et al. 2023). En presencia de enfermedad periodontal agresiva, los niveles de periostin son más bajos aún que en la enfermedad periodontal crónica (Aral et al. 2016; Jamesha et al. 2018). Más aún, cuando se presentan de forma simultánea enfermedades periodontales y enfermedades sistémicas, como la diabetes, los niveles son aún más bajos (Morsy and Ali 2020). Es por ello que se ha propuesto el uso de periostin como marcador de daño periodontal y susceptibilidad a la enfermedad (Aral et al. 2016; Sophia et al. 2020). Esto se debe a que, como nuestro grupo ha podido demostrar en el pasado, periostin influye en el mantenimiento de la estructura de soporte de los dientes y su disminución, como consecuencia de los estímulos inflamatorios y microbiológicos, conduce a una destrucción aún mayor de las estructuras periodontales (Padial-Molina et al. 2012; Padial-Molina et al. 2013; Padial-Molina et al. 2015), además de comprometer la migración y proliferación celular además de la organización de la matriz extracelular (Rosselli-Murai et al. 2013; Padial-Molina et al. 2014; Cobo et al. 2016). En cualquier caso, el tratamiento de la

enfermedad periodontal, incluso mediante terapia no quirúrgica (Kumaresan et al. 2016; Arslan et al. 2021), consigue aumentar los niveles de periostin en el fluido crevicular (Padial-Molina et al. 2015), aspecto también demostrado en el presente estudio. Este aumento, no obstante, es y debe ser transitorio, como también hemos observado en el presente estudio. De lo contrario, si se mantienen niveles elevados, se podría generar una situación de fibrosis patológica originando un tejido no competente desde el punto de vista funcional (Conway et al. 2014).

Por el contrario, al analizar las concentraciones de periostin en zonas distintas al propio surco, se ha observado un patrón inverso; es decir, mientras que, en la enfermedad periodontal, los niveles de periostin en el fluido crevicular son menores que en salud, los niveles en saliva están más elevados (Aral et al. 2016), de forma similar a lo descrito por Balli en muestras de suero, donde también encontró mayores niveles de periostin en pacientes con enfermedad periodontal en comparación con pacientes sanos, aunque en este caso sin diferencias estadísticamente significativas (Balli et al. 2015). Con estas premisas y el hecho demostrado en estudios previos de que periostin en suero disminuye con el tratamiento periodontal (Padial-Molina et al. 2015) junto al papel de periostin en el desarrollo de placas de ateroma (Bagnato et al. 2007; Schwanekamp et al. 2016), la hipótesis planteada en este estudio queda justificada. De hecho, la ausencia de periostin en ratones modificados aporta una ventaja adicional a la propia maduración de la placa de ateroma y es la reducción de la respuesta inflamatoria, de reclutamiento de macrófagos, así como un aumento de MMP-2 y MMP-13. Por este motivo, de forma similar a lo planteado en este estudio, se ha propuesto que la reducción terapéutica de periostin mediante fármacos antagonistas podría constituirse en potencial diana para el tratamiento de la

aterosclerosis mediante la reducción de las placas de ateroma (Schwanekamp et al. 2016). En nuestro caso, la reducción propuesta se debiera conseguir mediante el tratamiento periodontal. Sin embargo, esto no fue así en el presente estudio. Debemos buscar la explicación en estudios más recientes a los anteriormente citados. La valoración detallada de los mismos informa de ciertas inconsistencias. Así, mientras que en 2020 se informó de que los niveles de periostin en suero no son diferentes en las distintas condiciones periodontales (Sophia et al. 2020), en 2023 se ha observado que la presencia concomitante de enfermedad periodontal y coronaria genera diferencias en comparación con la presencia de sólo enfermedad periodontal (Mahendra et al. 2023). Es decir, la extrapolación del estudio de nuestro grupo de 2015 a la propuesta de que el tratamiento periodontal disminuye los niveles sistémicos de periostin debe ponerse en el contexto de los pacientes que se incluyeron en el estudio original frente a los incluidos en este, en el que se han seleccionado pacientes con múltiples patologías, lo que modifica la interacción sin lugar a duda.

Los pacientes cardiovasculares suelen sufrir otras patologías sistémicas concomitantes y están sometidos a tratamientos farmacológicos crónicos y diversos que pueden enmascarar o alterar los hallazgos específicos. Tanto es así que, aunque en nuestro estudio no se ha analizado de forma específica la influencia de la diabetes en los niveles de periostin, existe plausibilidad biológica para la existencia de esta relación, en la que, como se mencionó anteriormente, la presencia de diabetes disminuye aún más los niveles de periostin detectados en pacientes periodontales (Morsy and Ali 2020). A su vez la diabetes influye en la enfermedad cardiovascular al alterar, entre otros, la capacidad de curación normal por alteración de los mecanismos inflamatorios, constituyendo un

importante factor de confusión para la relación periodontal – cardiovascular (Tonetti et al. 2007; Offenbacher et al. 2009; Tonetti et al. 2013).

Junto a esto, debemos considerar también otros factores propios de las intervenciones realizadas. La enfermedad periodontal afecta, generalmente, a más de un cuadrante en la cavidad oral. Sin embargo, las recomendaciones para este tipo de estudios indican la necesidad de focalizar el tratamiento a aquel cuadrante en peores condiciones evitando tratamientos extensos que puedan incluir aún más factores de confusión. Por este motivo, en el grupo que recibió terapia quirúrgica se seleccionó el cuadrante con mayores sondajes o mayores sitios con sondajes elevados. Por el contrario, el grupo de terapia no quirúrgica recibió tratamiento en todos sus dientes; en base a esto, las diferencias a nivel sistémico pudieron quedar enmascaradas en la comparación, pudiendo haber recibido el mismo grado de agresividad global. Sin embargo, a diferencia de otros estudios en los que el tratamiento no quirúrgico también indujo diferencias en los niveles de periostin a nivel local, en el fluido crevicular (Kumaresan et al. 2016), nuestro estudio no los ha encontrado. Una posible explicación sea el tipo de terapia; mientras que nosotros hemos realizado raspado y alisado radicular, en el estudio liderado por Kumaresan se aplicó láser de bajo grado.

En el presente estudio también se analizaron una serie de marcadores de relevancia en la enfermedad aterosclerótica desde el punto de vista, concretamente, de la respuesta inflamatoria. En este sentido, podemos describir ciertas modificaciones, tanto a nivel de fluido crevicular como en suero, aunque nuevamente sin significación estadística entre grupos o tiempos. Aun así, es necesario realizar algunas observaciones respecto a los marcadores seleccionados. Hemos evaluado CRP, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, MIP-1 α y TNF- α en fluido

crevicular, así como CRP, fibrinógeno, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, L-Selectina, MIP-1 α , TNF- α y el factor de von Willebrand en suero. Estos marcadores están asociados con la respuesta adaptativa e innata y, a su vez, con la aterogénesis y disfunción endotelial, concretamente los niveles sistémicos de CRP, fibrinógeno, IL-6, L-selectina, TNF- α y el factor de von Willebrand; por lo tanto, se han establecido como predictores de enfermedad coronaria (Hong et al. 2021). En el presente estudio, IL-6, MIP-1 α y TNF- α mostraron una reducción de sus niveles en suero tras el tratamiento periodontal, aunque sin significación estadística. De estos, podemos describir particularmente la participación de IL-6 en el daño miocárdico en la fase crónica después del infarto y no en la aguda como la troponina (Kanda and Takahashi 2004), motivo por el que se seleccionó para el presente estudio. Respecto a MIP-1 α , es conocido que cuando se encuentra elevado existe un mayor riesgo de nuevos eventos cardiovasculares, al aumentar el reclutamiento de monocitos a la zona de inflamación, con lo que puede contribuir al aumento de tamaño de la placa de ateroma (de Jager et al. 2012) (de Jager et al. 2012). Por último, el TNF- α desempeña, a nivel cardiovascular, un papel determinante en la regulación de la contractilidad cardíaca y la resistencia periférica. Niveles elevados de TNF- α se han asociado con daño por isquemia-reperfusión, miocarditis y progresión de la insuficiencia cardíaca congestiva (Ferrari 1999). Por lo tanto, las variaciones de estos marcadores en nuestro estudio podrían indicar que el tratamiento periodontal promueve una mejora en el mantenimiento de la salud cardiovascular general.

Debemos, para terminar, considerar nuevos enfoques y cautelas en el entendimiento de la interacción entre patologías locales y sistémicas. Recientemente, Taylor y colaboradores han hecho una importante llamada a la cautela en la investigación y traslación clínica de la terapia periodontal,

particularmente la terapia no quirúrgica, como factor relevante en la mejora de las enfermedades sistémicas (Taylor et al. 2021). Tras realizar una revisión de revisiones y metaanálisis en la que han incluido 52 estudios, concluyen que, a pesar de la gran cantidad de estudios, revisiones y metaanálisis, existe una evidencia débil principalmente por la baja calidad de las revisiones realizadas respecto a la influencia de la terapia periodontal en la mejora de la salud sistémica.

El presente estudio no está exento de ciertas limitaciones que podrían explicar algunos de los resultados expuestos. El principal de ellos es el bajo número de individuos que fueron incluidos para estudio, que finalmente afectó el poder estadístico para detectar diferencias en los niveles de periostin en suero a lo largo del tiempo, una de las variables principales del estudio. Es necesario aclarar que el estudio fue diseñado como un estudio piloto, como se ha descrito.

Aun así, a pesar de estas limitaciones y otras posibles, el presente estudio ha realizado una aproximación válida y metodológicamente rigurosa al estudio de la plausibilidad biológica de la interacción entre las enfermedades periodontales y cardiovasculares por aterosclerosis a través de periostin. Aunque los resultados pueden ser no concluyentes, dispares o inconsistentes con otros estudios, sin duda alguna ofrecen oportunidades para futuros estudios con un tamaño de muestra más alto y un mayor número de biomarcadores en estudio con objeto de conseguir una visión más profunda y detallada del problema, incluyendo, además, el análisis individualizado de las diversas isoformas de periostin, entre las 3 descritas.



CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

En respuesta al objetivo global podemos concluir que, al contrario de lo planteado como hipótesis inicial, la evaluación del efecto del tratamiento de la enfermedad periodontal en la enfermedad aterosclerótica coronaria a través de los niveles circulantes de periostin no se produjo. Debe considerarse, eso sí, el limitado tamaño muestral y el carácter piloto del presente estudio clínico.

Respecto a nuestros objetivos de trabajo, podemos concluir:

1. La evaluación de los niveles basales de periostin en suero y fluido crevicular es posible con técnicas relativamente sencillas. Estos niveles son similares a los publicados en la literatura previa existente, no habiendo correlación entre ellos y la severidad de la enfermedad periodontal o aterosclerótica.
2. Los resultados obtenidos en este estudio confirman el aumento transitorio de periostin en fluido crevicular después de la cirugía periodontal, posiblemente cumpliendo un papel importante en el proceso de cicatrización. Sin embargo, los niveles en suero de esta proteína no se ven modificados de forma relevante tras la intervención quirúrgica.
3. La cirugía periodontal produjo una mejora clínica evidente de la enfermedad periodontal a través de la reducción de marcadores inflamatorios para esta enfermedad. No se observaron, en cambio, variaciones en los niveles de los marcadores de aterosclerosis analizados.



BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- Aarabi G, Zeller T, Seedorf H, Reissmann DR, Heydecke G, Schaefer AS, Seedorf U. 2017. Genetic susceptibility contributing to periodontal and cardiovascular disease. *J Dent Res.* 96(6):610-617.
- Abdolalian F, Bayani M, Afzali S, Nakhostin A, Almasi-Hashiani A. 2023. Periostin level in gingival crevicular fluid in periodontal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health.* 23(1):284.
- Alesutan I, Henze LA, Boehme B, Luong TTD, Zickler D, Pieske B, Eckardt K-U, Pasch A, Voelkl J. 2022. Periostin augments vascular smooth muscle cell calcification via β -catenin signaling. *Biomolecules.* 12(8):1157.
- Amar S, Engelke M. 2015. Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis. *Mol Oral Microbiol.* 30(3):171-185.
- Aral CA, Köseoğlu S, Sağlam M, Pekbağrıyanık T, Savran L. 2016. Gingival crevicular fluid and salivary Periostin levels in non-smoker subjects with chronic and aggressive periodontitis: Periostin levels in chronic and aggressive periodontitis. *Inflammation.* 39(3):986-993.
- Arslan R, Karsiyaka Hendek M, Kisa U, Olgun E. 2021. The effect of non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid periostin levels in patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Dis.* 27(6):1478-1486.
- Asakura M, Kitakaze M. 2009. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J.* 73(9):1568-76.
- Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, Haudenschild C, Eng JK, Lundgren DH, Han DK. 2007. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 6(6):1088-102.

- Balli U, Keles ZP, Avci B, Guler S, Cetinkaya BO, Keles GC. 2015. Assessment of periostin levels in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontal disease. *J Periodontal Res.* 50(6):707-713.
- Bartold PM, Lopez-Oliva I. 2020. Periodontitis and rheumatoid arthritis: An update 2012-2017. *Periodontol 2000.* 83(1):189-212.
- Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. 2000. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000.* 24:28-55.
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. 1996. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol.* 67(10s):1123-1137.
- Bobetsis YA, Graziani F, Gürsoy M, Madianos PN. 2020. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *Periodontol 2000.* 83(1):154-174.
- Bonnet N, Garnero P, Ferrari S. 2016. Periostin action in bone. *Mol Cell Endocrinol.* 432:75-82.
- Bonnet N, Gineyts E, Ammann P, Conway SJ, Garnero P, Ferrari S. 2013. Periostin deficiency increases bone damage and impairs injury response to fatigue loading in adult mice. *PloS One.* 8(10):e78347.
- Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ, Ferrari SL. 2009. The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. *J Biol Chem.* 284(51):35939-50.
- Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, Damrongsri D, Offenbacher S, Beck J, Madianos P, Sotres D, Chang Y-L, Koch G, et al. 2005. *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(7):1446-1451.
- Carasol M, Llodra JC, Fernández-Meseguer A, Bravo M, García-Margallo MT, Calvo-Bonacho E, Sanz M, Herrera D. 2016. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol.* 43(7):548-556.

- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 64(1):57-80.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, et al. 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 89 Suppl 1:S74-S84.
- Cheng CW, Wang CH, Lee JF, Kuo LT, Cherng WJ. 2012. Levels of blood periostin decrease after acute myocardial infarction and are negatively associated with ventricular function after 3 months. *J Investig Med*. 60(2):523-8.
- Cobo T, Vitoria CG, Solares L, Fontanil T, González-Chamorro E, Carlos FD, Cobo J, Cal S, Obaya AJ. 2016. Role of periostin in adhesion and migration of bone remodeling cells. *PloS One*. 11(1):e0147837.
- Contie S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, Clezardin P, Garnero P. 2011. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases. *Int J Cancer*. 128(2):352-60.
- Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CTJ, Kudo A. 2014. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 71(7):1279-1288.
- Conway SJ, Molkentin JD. 2008. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease. *Curr Genomics*. 9(8):548-55.
- D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. 2013. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Periodontol*. 84(4 Suppl):S85-S105.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Sacco RL,

- Papapanou PN. 2005. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness. The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation*. 111(5):576-582.
- Dorn GW 2nd. 2007. Periostin and myocardial repair, regeneration, and recovery. *N Engl J Med*. 357(15):1552-4.
 - Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. 2012. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 91(10):914-920.
 - Ferrari R. 1999. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 40(2):97-105.
 - Frangogiannis NG. 2019. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure. *Circ Res*. 125(1):117-146.
 - Garnero P. 2012. The contribution of collagen crosslinks to bone strength. *BoneKEy Rep*. 1:182.
 - Genco RJ, Borgnakke WS. 2020. Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies. *Periodontol 2000*. 83(1):40-45.
 - Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. 1999. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*. 70(7):711-723.
 - Gibson FC, Yumoto H, Takahashi Y, Chou H-H, Genco CA. 2006. Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *J Dent Res*. 85(2):106-121.
 - Gil H, Goldshtein M, Etzion S, Elyagon S, Hadad U, Etzion Y, Cohen S. 2022. Defining the timeline of periostin upregulation in cardiac fibrosis following acute myocardial infarction in mice. *Sci Rep*. 12(1):21863.
 - Hajishengallis G. 2014a. Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol*. 35(1):3-11.
 - Hajishengallis G. 2014b. Periodontitis: from microbial immune subversion to

- systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 15(1):30–44.
- Hajishengallis G, Chavakis T. 2021. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*. 21(7):426–440.
 - Hajishengallis G, Lamont RJ. 2014. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 44(2):328–338.
 - Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, et al. 2010. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest*. 120(7):2292–2306.
 - Hamilton DW. 2008. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal*. 2(1–2):9–17.
 - Han X, Boisvert WA. 2015. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thromb Haemost*. 113(3):505–512.
 - Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 352(16):1685–1695.
 - Hasturk H, Kantarci A. 2015. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontol 2000*. 69(1):255–273.
 - He X, Bao Y, Shen Y, Wang E, Hong W, Ke S, Jin X. 2018. Longitudinal evaluation of serum periostin levels in patients after large-artery atherosclerotic stroke: A prospective observational study. *Sci Rep*. 8(1):11729.
 - Herrera D, Molina A, Buhlin K, Klinge B. 2020. Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontol 2000*. 83(1):66–89.
 - Herrera D, Sanz M, Shapira L, Brotons C, Chapple I, Frese T, Graziani F,

Hobbs FDR, Huck O, Hummers E, et al. 2023. Association between periodontal diseases and cardiovascular diseases, diabetes and respiratory diseases: Consensus report of the Joint Workshop by the European Federation of Periodontology (EFP) and the European arm of the World Organization of Family Doctors (WONCA Europe). *J Clin Periodontol*. 50(6):819-841.

- Hill AB. 1965. The environment and disease: Association or causation? *Proc R Soc Med*. 58(5):295-300.
- Hixson JE, Shimmin LC, Montasser ME, Kim DK, Zhong Y, Ibarguen H, Follis J, Malcom G, Strong J, Howard T, et al. 2011. Common variants in the periostin gene influence development of atherosclerosis in young persons. *Arter Thromb Vasc Biol*. 31(7):1661-7.
- Hong L-Z, Xue Q, Shao H. 2021. Inflammatory markers related to innate and adaptive immunity in atherosclerosis: Implications for disease prediction and prospective therapeutics. *J Inflamm Res*. 14:379-392.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Min Res*. 14(7):1239-49.
- Hu Y, Wang X, Ding F, Liu C, Wang S, Feng T, Meng S. 2022. Periostin renders cardiomyocytes vulnerable to acute myocardial infarction via pro-apoptosis. *ESC Heart Fail*. 9(2):977-987.
- Hujoel PP, White BA, García RI, Listgarten MA. 2001. The dentogingival epithelial surface area revisited. *J Periodontal Res*. 36(1):48-55.
- Hunter W. 1900. Oral sepsis as a cause of disease. *Br Med J*. 2(2065):215-216.
- Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K. 2014. Periostin

- in allergic inflammation. *Allergol Int.* 63(2):143-51.
- de Jager SCA, Bongaerts BWC, Weber M, Kraaijeveld AO, Rousch M, Dimmeler S, van Dieijen-Visser MP, Cleutjens KBJM, Nelemans PJ, van Berkel TJC, et al. 2012. Chemokines CCL3/MIP1 α , CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PloS One.* 7(9):e45804.
 - Jamesha FI, Maradi AP, Chithresan K, Janakiram S, Maddur PK, Rangaraju R. 2018. Comparison of gingival crevicular fluid periostin levels in healthy, chronic periodontitis, and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 22(6):480-486.
 - Jepsen S, Suvan J, Deschner J. 2020. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. *Periodontol 2000.* 83(1):125-153.
 - Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, Shikotra A, Carter R, Audusseau S, Hamid Q, et al. 2012. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 130(3):647-654 e10.
 - Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon MJ. 2008. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement.* 4(4):242-250.
 - Kamer AR, Craig RG, Niederman R, Fortea J, de Leon MJ. 2020. Periodontal disease as a possible cause for Alzheimer's disease. *Periodontol 2000.* 83(1):242-271.
 - Kanda T, Takahashi T. 2004. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J.* 45(2):183-193.
 - Kanwar SS, Stone GW, Singh M, Virmani R, Olin J, Akasaka T, Narula J. 2016. Acute coronary syndromes without coronary plaque rupture. *Nat Rev Cardiol.* 13(5):257-265.
 - Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T,

- Murray CJL, Marcenes W, Collaborators G 2015 OH. 2017. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res.* 96(4):380–387.
- Katsuragi N, Morishita R, Nakamura N, Ochiai T, Taniyama Y, Hasegawa Y, Kawashima K, Kaneda Y, Ogihara T, Sugimura K. 2004. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. *Circulation.* 110(13):1806–13.
 - Khurshid Z, Mali M, Adanir N, Zafar MS, Khan RS, Latif M. 2020. Periostin: Immunomodulatory effects on oral diseases. *Eur J Dent.* 14(3):462–466.
 - Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, Shelburne CE, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV. 2011. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *J Dent Res.* 90(6):752–8.
 - Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, Giannobile WV. 2014. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *J Clin Periodontol.* 41(2):113–120.
 - Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. 2007. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* 13(8):962–9.
 - Kumaresan D, Balasundaram A, Naik VK, Appukuttan DP. 2016. Gingival crevicular fluid periostin levels in chronic periodontitis patients following nonsurgical periodontal treatment with low-level laser therapy. *Eur J Dent.* 10(4):546–550.
 - Larsen SB, Grove EL, Würtz M, Neergaard-Petersen S, Hvas A-M, Kristensen SD. 2015. The influence of low-grade inflammation on platelets in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 114(3):519–529.
 - Li G, Jin R, Norris RA, Zhang L, Yu S, Wu F, Markwald RR, Nanda A, Conway SJ, Smyth SS, et al. 2010. Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α v β 3 and α v β 5 and focal

- adhesion kinase (FAK) pathway. *Atherosclerosis*. 208(2):358-65.
- Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. 2013. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 38(6):1092-1104.
 - Lindhe J, Berglund T, Giannobile WV, Lang NP, Sanz M. 2022. *Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 7th ed. New Jersey, USA: John Wiley.
 - Ling L, Cheng Y, Ding L, Yang X. 2014. Association of serum periostin with cardiac function and short-term prognosis in acute myocardial infarction patients. *PloS One*. 9(2):e88755.
 - Liu W, Zi M, Tsui H, Chowdhury SK, Zeef L, Meng QJ, Travis M, Prehar S, Berry A, Hanley NA, et al. 2013. A novel immunomodulator, FTY-720 reverses existing cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by targeting NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling and periostin. *Circ Heart Fail*. 6(4):833-44.
 - Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Taubert KA, Newburger JW, Gornik HL, Gewitz MH, et al. 2012. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 125(20):2520-44.
 - Löe H. 1967. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*. 38(6):610-616.
 - Loesche WJ, Schork A, Terpenning MS, Chen YM, Dominguez BL, Grossman N. 1998. Assessing the relationship between dental disease and coronary heart disease in elderly U.S. veterans. *J Am Dent Assoc* 1939. 129(3):301-311.
 - Lopez-Chaichio L, Padial-Molina M, O'Valle F, Gil-Montoya JA, Catena A, Galindo-Moreno P. 2021. Oral health and healthy chewing for healthy

cognitive ageing: A comprehensive narrative review. *Gerodontology*. 38(2):126-135.

- Mael-Ainin M, Abed A, Conway SJ, Dussaule JC, Chatziantoniou C. 2014. Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 25(8):1724-36.
- Mahendra J, Muralidharan J, Srinivasan S, Mahendra L, Cherian SM, Fathima L, Prakash P, Namasivayam A, Dave PH, Bedi M, et al. 2023. Calprotectin and periostin levels in periodontitis patients with coronary artery disease. *Oral Dis*.
- Mammen MJ, Scannapieco FA, Sethi S. 2020. Oral-lung microbiome interactions in lung diseases. *Periodontol 2000*. 83(1):234-241.
- Marfil-Alvarez R, Mesa F, Arrebola-Moreno A, Ramirez-Hernandez JA, Magan-Fernandez A, O'Valle F, Galindo-Moreno P, Catena A. 2014. Acute myocardial infarct size is related to periodontitis extent and severity. *J Dent Res*. 93(10):993-8.
- Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, Ravaud P, Nabet C, Sixou M, Vergnes J-N. 2016. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *J Clin Periodontol*. 43(5):390-400.
- Morelli T, Neiva R, Nevins ML, McGuire MK, Scheyer ET, Oh T-J, Braun TM, Nör JE, Bates D, Giannobile WV. 2011. Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. *J Dent Res*. 90(4):456-462.
- Morsy SM, Ali NG. 2020. The effect of non- surgical periodontal therapy on periostin level in the gingival crevicular fluid of type II diabetic patients with periodontitis. *Egypt Dent J*. 66(4):2261-2269.
- Muñoz Aguilera E, Suvan J, Orlandi M, Miró Catalina Q, Nart J, D'Aiuto F. 2021. Association between periodontitis and blood pressure highlighted in systemically healthy individuals: Results from a nested case-control study. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 77(5):1765-1774.

- Nijakowski K, Gruszczyński D, Kolasińska J, Kopała D, Surdacka A. 2022. Periodontal disease in patients with psoriasis: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 19(18):11302.
- Nikoloudaki G, Creber K, Hamilton DW. 2020. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol*. 318(6):C1065-C1077.
- Nishiyama T, Kii I, Kashima TG, Kikuchi Y, Ohazama A, Shimazaki M, Fukayama M, Kudo A. 2011. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PloS One*. 6(4):e18410.
- Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J, et al. 2007. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem*. 101(3):695-711.
- Nwizu N, Wactawski-Wende J, Genco RJ. 2020. Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. *Periodontol 2000*. 83(1):213-233.
- Offenbacher S, Beck JD, Moss K, Mendoza L, Paquette DW, Barrow DA, Couper DJ, Stewart DD, Falkner KL, Graham SP, et al. 2009. Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *J Periodontol*. 80(2):190-201.
- Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 67(10S):1103-1113.
- Padial-Molina M, Gonzalez-Perez G, Martin-Morales N, Sanchez-Fernandez E, O'Valle F, Galindo-Moreno P. 2023. Periostin in the relation between periodontal disease and atherosclerotic coronary artery disease: A pilot

randomized clinical study. *J Periodontal Res.*

- Padial-Molina M, Volk SL, Rios HF. 2014. Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor α and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. *J Periodontal Res.* 49(3):405-414.
- Padial-Molina M, Volk SL, Rios HF. 2015. Preliminary insight into the periostin leverage during periodontal tissue healing. *J Clin Periodontol.* 42(8):764-772.
- Padial-Molina M, Volk SL, Rodriguez JC, Marchesan JT, Galindo-Moreno P, Rios HF. 2013. Tumor necrosis factor- α and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 84(5):694-703.
- Padial-Molina M, Volk SL, Taut AD, Giannobile WV, Rios HF. 2012. Periostin is down-regulated during periodontal inflammation. *J Dent Res.* 91(11):1078-1084.
- Page RC, Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 14:9-11.
- Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, Flanagan CL, Hollister SJ, Giannobile WV. 2012. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials.* 33(1):137-145.
- Park CH, Rios HF, Taut AD, Padial-Molina M, Flanagan CL, Pilipchuk SP, Hollister SJ, Giannobile WV. 2014. Image-based, fiber guiding scaffolds: a platform for regenerating tissue interfaces. *Tissue Eng Part C Methods.* 20(7):533-542.
- Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, et al. 2012. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies

- on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) * Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 33(13):1635-1701.
- Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GMB, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH. 2007. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol.* 78(8):1491-1504.
 - Polizzotti BD, Arab S, Kuhn B. 2012. Intrapericardial delivery of gelfoam enables the targeted delivery of Periostin peptide after myocardial infarction by inducing fibrin clot formation. *PloS One.* 7(5):e36788.
 - Pozo E, Mesa F, Ikram MH, Puertas A, Torrecillas-Martínez L, Ortega-Oller I, Magán-Fernández A, Rodríguez-Martínez MD, Padial-Molina M, Sánchez-Fernández E, et al. 2016. Preterm birth and/or low birth weight are associated with periodontal disease and the increased placental immunohistochemical expression of inflammatory markers. *Histol Histopathol.* 31(2):231-237.
 - Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R, Sen S, Kumar M. 2014. Periodontal pathogens in atheromatous plaque. *Indian J Pathol Microbiol.* 57(2):259-264.
 - Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldá S, Progulske-Fox A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol.* 84(4S):S30-S50.
 - Rezaei B, Bayani M, Anvari M, Vahed P. 2021. Evaluation of periostin levels in gingival crevicular fluid in association between coronary heart disease and chronic periodontitis. *Dent Res J.* 18:46.
 - Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, Rogers R, Chen Z, Maeda M, Kruzynska-Frejtak A, et al. 2005. Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like

phenotype. *Mol Cell Biol.* 25(24):11131–44.

- Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. 2008. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol.* 79(8):1480–90.
- Rosselli-Murai LK, Almeida LO, Zagni C, Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Volk SL, Murai MJ, Rios HF, Squarize CH, Castilho RM. 2013. Periostin responds to mechanical stress and tension by activating the MTOR signaling pathway. *PloS One.* 8(12):e83580.
- Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, et al. 2020. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 76(25):2982–3021.
- Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, Sculean A, Tonetti MS. 2020. Treatment of stage I–III periodontitis–The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol.* 47(Suppl 22):4–60.
- Schenkein HA, Loos BG. 2013. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol.* 40(0 14):S51–S69.
- Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. 2020. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol 2000.* 83(1):90–106.
- Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. 2010. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Trials.* 11:32.
- Schwanekamp JA, Lorts A, Vagnozzi RJ, Vanhoutte D, Molkentin JD. 2016. Deletion of periostin protects against atherosclerosis in mice by altering inflammation and extracellular matrix remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36(1):60–68.
- Sheiham A, Netuveli GS. 2002. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol*

2000. 29(1):104-21.

- Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, et al. 2008. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med*. 205(2):295-303.
- Silva DN de A, Casarin M, Monajemzadeh S, Bezerra B de B, Lux R, Pirih FQ. 2022. The microbiome in periodontitis and diabetes. *Front Oral Health*. 3:859209.
- Socransky SS, Haffajee AD. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 28:12-55.
- Sophia K, Suresh S, Sudhakar U, Abdul Cader S, Vardhini VM, Arunachalam LT, Jean SC. 2020. Comparative evaluation of serum and gingival crevicular fluid periostin levels in periodontal health and disease: A biochemical study. *Cureus*. 12(3):e7218.
- Stillman PR, McCall JO. 1922. *A Textbook of Clinical Periodontia: A Study of the Causes and Pathology of Periodontal Disease and a Consideration of Its Treatment*. Macmillan.
- Taylor HL, Rahurkar S, Treat TJ, Thyvalikakath TP, Schleyer TK. 2021. Does nonsurgical periodontal treatment improve systemic health? *J Dent Res*. 100(3):253-260.
- Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, Naylor M, Konno T, Gorham JM, Wolf CM, et al. 2010. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest*. 120(10):3520-9.
- Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VEA, Abbas F, D'Aiuto F, Kastelein JJP, Loos BG. 2014. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 41(1):70-79.
- Tin NT, Van Minh H, Thang DC, Phuong PTM. 2023. Serum periostin levels in

acute myocardial infarction patients: A 3-month follow-up study. *Acta Inf Med.* 31(3):195-199.

- Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J. 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med.* 356(9):911-20.
- Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 89 Suppl 1:S159-S172.
- Tonetti MS, Van Dyke TE, working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol.* 84(4 Suppl):S24-29.
- Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW. 2016. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. *Cell Tissue Res.* 365(3):453-465.
- Wang F, Song Y, Jiang Y, Yang C, Ding Z. 2011. Associations among periostin gene polymorphisms, clinical parameters and heart failure: a case-control study in 1104 Chinese individuals. *J Cardiovasc Med.* 12(7):469-74.
- Wang F, Yang C, Song Y, Jiang Y, Ding Z. 2012. Periostin gene polymorphisms, protein levels and risk of incident coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 39(1):359-367.
- Wang Z, Li G, Li M, Hu L, Hao Z, Li Q, Sun C. 2022. Periostin contributes to the adventitial remodeling of atherosclerosis by activating adventitial fibroblasts. *Atheroscler Plus.* 50:57-64.
- Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. 2017. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. Brussels: European Heart Network.
- Yang L, Guo T, Chen Y, Bian K. 2022. The multiple roles of periostin in non-

neoplastic disease. *Cells*. 12(1):50.

- Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, Shao Y, Ma W, Yang D, Zhang J. 2014. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 63(5):373-8.



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

9.A. Comunicaciones en congresos científicos

- **González-Pérez G**, Padial-Molina M, Martínez-Pintos A, Pedrinaci-Peñalver I, O'Valle F, Galindo-Moreno P. Periostin en la estabilización extracelular para la regeneración tisular. XXXIII International ICOI World Congress - 3rd SCOI. 29 de marzo - 2 abril de 2016, Barcelona.
- **González-Pérez G**, Padial-Molina M, Sánchez-Fernández E, Martínez-Pintos A, Pedrinaci-Peñalver I, Olachea A, O'Valle F, Galindo-Moreno Pablo. Periostin para la homeostasis y la regeneración tisular. 50^o Annual Meeting. 12-14 de mayo de 2016, Valencia.
- **González-Pérez G**, Galindo-Moreno P, Gutierrez-Garrido L, Ríos H, Sánchez-Fernández E, O'Valle-Ravassa F, Padial-Molina M. Periostin for the regeneration of multitissue interfaces. Branemark Memorial Symposium. 11 y 12 de noviembre de 2016, Madrid. Primer premio al mejor póster de investigación.
- **González-Pérez G**, Galindo-Moreno P, Gutierrez-Garrido L, Ríos H, Sánchez-Fernández E, O'Valle-Ravassa F, Padial-Molina M. Terapia génica con Periostin para la regeneración de interfases multitisulares. Congreso Nacional de Cirugía Bucal SECIB. 17-19 de noviembre de 2016, Málaga. Primer premio a la mejor comunicación oral de investigación.
- **González-Pérez G**, Galindo-Moreno P, Farias VA, Gutierrez-Garrido L, Couso-Queiruga E, O'Valle-Ravassa F, Padial-Molina M. Periostin en

enfermedad periodontal y cardiovascular. XIV Congreso Internacional de la Sociedad Española de Medicina Oral. 7-9 de junio de 2017, Granada.

9.B. Publicación en revista internacional con índice de impacto

- REFERENCIA COMPLETA: Padial-Molina M, **Gonzalez-Perez G**, Martin-Morales N, Sanchez-Fernandez E, O'Valle F, Galindo-Moreno P. Periostin in the relation between periodontal disease and atherosclerotic coronary artery disease: A pilot randomized clinical study. J Periodontal Res. 2023 Dec 22. Epub ahead of print. PMID: 38140743.
- DISPONIBLE EN:
 - <https://doi.org/10.1111/jre.13229>
- INDICIOS DE CALIDAD:
 - Índice de impacto de la revista (2022): 3,5
 - Orden en la categoría "Dentistry, Oral Surgery and Medicine": 26 de 91
 - Cuartil "Dentistry, Oral Health and Medicine": Q2

ANEXOS



10. ANEXOS

10.A.Aprobación ética por la Universidad de Granada



Universidad de Granada
Vicerrectorado de Política
Científica e Investigación

COMISIÓN DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

La Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, oído el informe preliminar del Presidente del Comité en Investigación Humana, emite informe favorable a la metodología en la investigación titulada “PERIOSTIN Y ENFERMEDAD PERIODONTAL COMO MODIFICADORES DE ENFERMEDAD CORONARIA POR ATHEROSCLEROSIS” que dirige D./Dña Miguel Padial Molina, quedando registrada con el nº: 937.

Granada a 27 de enero de 2015


LA PRESIDENTA
Fdo: Mª Dolores Suárez Ortega


LA SECRETARIA
Fdo: Irene Luque Fernández

10.B.Aprobación ética por el Comité de Ética en la Investigación Biomédica de Granada

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a: Juan Morales Arcas como secretario/a del CEI de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Periostin y enfermedad periodontal como modificadores de la enfermedad coronaria por aterosclerosis
Protocolo, Versión: 2
HIP, Versión: 2
CI, Versión: 2

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en GRANADA a 05/04/2016

D/D^a: Juan Morales Arcas, como Secretario/a del CEI de Granada



Código Seguro De Verificación:	5978c1fb9e519af8a8464a2a00abc34a893379a9	Fecha	05/04/2016
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.		
Firmado Por	Juan Morales Arcas		
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaleetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/5978c1fb9e519af8a8464a2a00abc34a893379a9	Página	1/2



10.C.Hoja de información y Consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE GRANADA CONSENTIMIENTO PARA SER PARTE DE UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

INFORMACIÓN SOBRE ESTE DOCUMENTO

Usted puede ser elegible para participar en un proyecto de investigación. Este documento le proporcionará toda la información relevante sobre el mismo. Se describirán el estudio así como los riesgos y potenciales beneficios así como las personas y entidades implicadas.

Por favor, lea atentamente esta información. Una vez haya terminado, debe hablar con el investigador a cargo y preguntar tantas preguntas como desee. Usted también podrá mantener una copia de este documento para compartir la información con otras personas que le puedan ayudar en la decisión de participar o no en el estudio, como familiares, amigos u otros doctores.

Si finalmente decide participar, será necesario que firme al final de este documento.

1. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ESTUDIO Y LOS INVESTIGADORES

1.1. Título del Estudio: Periostin y enfermedad periodontal como modificadores de enfermedad coronaria por aterosclerosis

1.2. Fuente de financiación del proyecto: Programa Andalucía Talent Hub, concedido por la Agencia Andaluza del Conocimiento y cofinanciado a través del fondo del Séptimo Programa Marco, Acciones Marie Curie, Personas, Cofinanciación de Programas Regionales, Nacionales e Internacionales, y la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía.

1.3. Datos del Investigador Responsable:

Nombre y apellidos: Miguel Padial Molina

D.N.I.: 74721686-E

Centro, teléfono, correo electrónico: Facultad de Odontología de Granada, 958249032, mipadial@ugr.es

2. ¿PARA QUE ES ESTE ESTUDIO?

El objetivo de este estudio es el de evaluar si la enfermedad periodontal o periodontitis influye en la enfermedad coronaria por aterosclerosis mediante una proteína llamada periostin. Se pretende comprobar si esa proteína disminuye en su sangre y mejora su estado cardiovascular a la vez que aumenta en sus encías para ayudar en la curación de la periodontitis.

3. ¿QUIÉN PARTICIPARÁ EN ESTE ESTUDIO?

La participación en el estudio es completamente voluntaria, no tiene que participar si no lo desea. Además, puede dejar el estudio en cualquier momento sin ningún perjuicio para usted o sus futuros tratamientos en la Facultad de Odontología.

3.1. ¿Quién puede participar?

Podrán participar en el estudio los pacientes que cumplan los siguientes requisitos:

Paciente de 75 años o menos con enfermedad coronaria aterosclerótica definida por bloqueo de una arteria coronaria $\geq 50\%$ o evento coronario en los 6-36 meses anteriores (infarto de miocardio, bypass o stent en arteria coronaria) y enfermedad periodontal crónica severa que necesite tratamiento quirúrgico periodontal en al menos un cuadrante con al menos 6 dientes naturales que no necesiten ser extraídos excluyendo terceros molares, al

menos el 50% de ellos con bolsas periodontales de al menos 6mm en al menos 4 de 6 sitios por diente, al menos 2 dientes con pérdida ósea en radiografía $\geq 30\%$ y con $\geq 10\%$ de sitios con sangrado al sondaje.

3.2. ¿Quién no puede participar?

No podrán participar pacientes que hayan sufrido un evento coronario en los 6 meses anteriores, enfermedad hepática o pulmonar no controlada, tumor maligno, enfermedad autoinmune, desórdenes neurológicos o psiquiátricos, diabetes mellitus tipo II con HgA1c $> 8\%$, pacientes insulino-dependientes, fallo renal (creatinina $> 1.5\text{mg/dL}$), historia o presencia de infección aguda o crónica diferente a la periodontal, terapia antibiótica y/o periodontal en los 3 meses anteriores, malnutrición, historia de alcoholismo o abuso de drogas, edentulismo total, tratamiento ortodóncico actual o existencia de otras condiciones dentales que requieran tratamiento previo o, en general, cualquier otra condición que suponga una contraindicación para el tratamiento quirúrgico periodontal o aquellos pacientes que no deseen o no puedan prestar su consentimiento para participar en el estudio.

Además, durante el curso del estudio, los pacientes serán excluidos si la enfermedad periodontal progresa más de 2 mm en la reevaluación a los 3 meses, (re)infarto, (re)intervención cardiovascular, muerte o deseo de no continuar participando en el estudio o fallo de asistencia a las visitas de seguimiento.

3.3. ¿Cuántos pacientes se incluirán?

Para que los resultados del estudio sean científicamente válidos, se necesitan un mínimo de 15 pacientes por grupo.

4. ¿QUÉ IMPLICA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

4.1. ¿Qué pasará si participo?

Tras la evaluación de los criterios de inclusión/exclusión, de las medidas de su encía y de su radiografía, junto con otros datos que podemos necesitar de su médico, usted será incluido en el estudio y se le asignará a uno de los dos grupos siguientes: grupo control o grupo test. A cada grupo se le realizará un tratamiento distinto. No podemos saber en qué grupo le tocará participar porque se asigna de forma aleatoria para evitar cualquier influencia sobre los resultados del estudio.

4.2. ¿Qué pasará exactamente si se me asigna el grupo test?

Como parte de su enfermedad periodontal, usted necesitará tratamiento. La forma básica y más importante de tratamiento periodontal consiste en una limpieza bucal para eliminar el cálculo que se acumula en sus dientes y raíces. Cuando las bolsas periodontales son muy profundas, no se puede limpiar correctamente hasta el fondo de las mismas por lo que es necesario hacer una pequeña intervención para poder ver completamente la raíz del diente y poder limpiarla. Además, se aprovecha esa intervención para eliminar parte de la encía que está inflamada para que cicatrice bien y se vuelva a adaptar de nuevo a sus dientes que ahora estarán limpios. Esta intervención se hará sólo en la parte de su boca que esté en peores condiciones, es decir, que tenga las bolsas más profundas.

4.3. ¿Qué pasará en el resto de mi boca o si se me asigna el grupo control?

El resto de su boca será limpiada pero sólo por encima de la línea de la encía. Esta limpieza ayudará a entretener la enfermedad. Además, le recomendaremos cómo limpiar sus dientes en casa para que mejore el cuidado de su boca.

4.4. ¿Se tomarán algunas muestras?

Sí. Para poder analizar la proteína periostin y su enfermedad cardiovascular, además de la exploración médica y dental rutinaria, tomaremos muestras de su saliva, líquido de la encía

(fluido crevicular) y sangre. En estas muestras mediremos cuanto periostin hay y cuanto de otros productos importantes en la enfermedad cardiovascular por ateroma, como colesterol, glucosa, y otros.

Para poder estudiar como cambian en el tiempo tras el tratamiento de las encías (ya sea con cirugía o con limpieza normal), necesitaremos tomar las muestras varias veces: el primer día de tratamiento, a las 2 semanas, a los 3 y a los 6 meses.

Para poder saber mejor cómo está su sistema vascular, tomaremos un electrocardiograma el primer día y a los 6 meses. También mediremos su presión arterial y su peso en cada visita.

4.5. ¿Cuántas veces tendré que venir a la clínica y por cuánto tiempo?

En total, usted deberá venir a la clínica 6 veces más, además de hoy: el día de comienzo (cirugía si usted es asignado al grupo test), a los 7 días, a las 2 y 4 semanas y a los 3 y 6 meses. El primer día será el de su visita más larga, de unas 2-3 horas como máximo. El resto será de 1 hora o menos.

4.6. ¿Cuándo se acabará mi participación en el estudio?

El estudio tiene una duración de 6 meses desde el día de comienzo del tratamiento.

Las muestras que tomemos las mantendremos congeladas hasta que tengamos las de todos los pacientes y podamos empezar a analizarlas. Una vez analizadas, las muestras restantes serán destruidas.

Además, si su enfermedad empeora o no puede acudir a las citas de revisión, es posible que usted no pueda seguir participando en el estudio. Usted también puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento por cualquier motivo sin ninguna consecuencia para usted.

5. ¿CUÁLES SON LOS RIESGOS Y BENEFICIOS?

5.1. ¿Qué riesgos hay si decido participar en el estudio? ¿Qué harán los investigadores para reducir esos riesgos?

El presente estudio presenta una serie de riesgos que deben ser considerados:

- 1) La participación en el estudio puede suponer un mayor número de visitas que en un tratamiento rutinario. Los pacientes participantes serán informados oportunamente y valorados extensamente por su tiempo y buena disposición por los beneficios potenciales de los resultados de este estudio. En todo momento se informará al paciente de su participación voluntaria y su derecho a que sea interrumpida si así lo desea. No obstante, se harán los esfuerzos oportunos para minimizar la pérdida de seguimiento del paciente que pueda comprometer los resultados finales del estudio y, por tanto, minimizar el esfuerzo realizado por el resto de pacientes, la entidad financiadora y el equipo clínico.
- 2) Todos los procedimientos de intervención realizados sobre pacientes con enfermedad periodontal y aterosclerosis conllevan un riesgo que no se incrementa por la participación en el estudio. Siempre se seguirán las recomendaciones de tratamiento para pacientes cardiovasculares formuladas por la American Heart Association (AHA) y, específicamente, aquellas indicadas por el equipo de cardiología encargado del seguimiento del paciente.
- 3) A los pacientes diagnosticados de enfermedad periodontal se les debe ofrecer el correspondiente tratamiento. Es por esto que sólo incluimos pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal crónica que se caracteriza por un patrón no agresivo y muy lenta progresión, de forma que ni en el grupo control ni en los cuadrantes no

tratados con cirugía en el grupo test existe un riesgo inasumible por la duración del estudio (6 meses). En cualquier caso, si la enfermedad progresa en la evaluación a los 3 meses, la estrategia de tratamiento será modificada y/o el paciente excluido del estudio como se especifica en los criterios de exclusión secundarios. El riesgo de esta situación ha sido asumido en estudios similares por el gran beneficio que supone el conocer más sobre la interacción entre enfermedad periodontal y aterosclerosis.

- 4) La enfermedad periodontal suele afectar a más de un cuadrante de la cavidad oral. Es por esto que para evitar un empeoramiento de la enfermedad se establecerá un protocolo de mantenimiento mediante limpieza de cálculo supragingival e instrucciones de higiene oral en ambos grupos para reducir el riesgo mencionado en el punto anterior, siendo la única diferencia que en el grupo test se interviene además quirúrgicamente el cuadrante en peores condiciones.
- 5) El hecho de realizar una evaluación periodontal conlleva cierto riesgo de paso de bacterias a la sangre. Es por esto que, siguiendo las recomendaciones de la AHA, no se incluirán pacientes que hayan sufrido un evento cardiovascular en los 6 meses anteriores.
- 6) Si es necesario, se recetarán los necesarios anti-inflamatorios (ibuprofeno o metamizol) y/o antibióticos (amoxicilina o metronidazol).
- 7) La limpieza del cálculo supragingival puede conllevar cierto malestar y sensibilidad dental. Estos efectos suelen ser pasajeros y desaparecen en días. Si el problema persiste, se prescribirá pasta dental desensibilizante.
- 8) El uso prolongado de clorhexidina incluso a bajas concentraciones puede causar tinciones dentarias que se eliminan mediante limpieza bucal rutinaria que será realizada en todos los pacientes al finalizar el estudio.
- 9) La extracción de sangre puede provocar cierto malestar y/o hematoma en la zona de punción que desaparecerá en días sin necesidad de intervención. El riesgo será minimizado mediante el apropiado entrenamiento del personal del estudio.
- 10) En casos muy limitados, el paciente puede sufrir desvanecimientos durante el tratamiento dental o la extracción de sangre. El equipo de investigación y personal asistente de la Facultad de Odontología están perfectamente entrenados y acreditados para tratar estas situaciones y, en caso necesario, recibir asistencia de personal especializado.
- 11) La exposición a las radiografías propuestas supone una mínima exposición radiológica, tanto para el personal como para el paciente. Aún así se emplearán las medidas de protección rutinarias que incluyen mandil de plomo y collar tiroideo.
- 12) La esterilidad y precaución frente a exposiciones accidentales a patógenos serán preservadas en todo momento mediante el uso de material estéril y de un solo uso junto con las barreras de prevención universales (guantes, mascarilla, etc.).
- 13) Todas las muestras serán almacenadas a -80°C hasta su análisis. No se incluirá ningún tipo de identificación personal sino sólo el número de paciente de estudio.

5.2. ¿Qué pasará si sufro un daño, mi enfermedad empeora o sufro alguna consecuencia como resultado de mi participación en este estudio?

El estudio propuesto no supone un riesgo superior al que tendría en cualquier otra circunstancia en la que usted recibiera tratamiento de su enfermedad periodontal. Como cualquier procedimiento, no está completamente exento de riesgo.

El mayor riesgo está en la progresión de la enfermedad. Durante todas las visitas de seguimiento comprobaremos que su enfermedad sigue bajo control y, en caso contrario, cambiaremos el tratamiento.

5.3. Si participo en este estudio, ¿qué pasará con mi tratamiento regular? ¿Podré participar en otros estudios?

Usted debe seguir su tratamiento médico habitual, es imprescindible. También es imprescindible que nos comunique la medicación que toma y cualquier aspecto relacionado con su salud porque puede ser importante para el tratamiento que le vamos a hacer.

No es recomendable participar en más de un estudio a la vez.

5.4. ¿Se me informará si durante mi participación en el estudio se descubre algo que pueda cambiar mi deseo de permanecer en el estudio?

Sí. El investigador responsable le informará de cualquier información nueva que pueda aparecer relacionada con el presente estudio. Puede incluso que se necesite que firme un consentimiento nuevo para permanecer en el estudio.

6. ¿HAY OTRAS OPCIONES?

6.1. Si decido no participar en el estudio, ¿qué otras opciones tengo?

Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Si decide no participar, esto no supondrá ningún impedimento para su futura atención dental en la Facultad de Odontología. De hecho, usted será aconsejado sobre las mejores opciones existentes a juicio del investigador responsable aunque es posible que usted necesite re-iniciar el proceso de evaluación regular que se sigue en la Facultad de Odontología y del que será informado oportunamente.

7. ¿CUÁNDO TERMINA EL ESTUDIO?

7.1. Si quiero dejar el estudio, ¿qué debo hacer?

Usted es libre de dejar el estudio en cualquier momento. Si así lo decide, deberá comunicárselo al investigador responsable, cuya información se encuentra en la Sección 10 de este documento. Si opta por explicar las razones para dejar el estudio, es posible que estas se incluyan en su hoja clínica de seguimiento.

7.2. ¿Puedo ser excluido del estudio por el investigador responsable aunque yo quiera continuar?

Sí, Existen diversas razones por las que esto puede pasar, entre las que se incluyen:

- El investigador cree que no es lo mejor para usted.
- Usted debe ser excluido por las razones expuestas en el punto 3.2.
- Usted no sigue las recomendaciones del investigador o falta a sus visitas de seguimiento.
- El estudio es suspendido o cancelado.

8. ¿CUÁLES SON LOS COSTES? ¿Y LOS BENEFICIOS?

8.1. ¿Cómo me beneficiaré de este estudio?

En primer lugar, usted recibirá tratamiento de su enfermedad periodontal de forma gratuita tanto si le corresponde un grupo como otro por las molestias ocasionadas por el número de visitas, desplazamientos o ausencias laborales así como la toma de muestras. Durante las visitas de seguimiento y al final del estudio se le aconsejará de forma personalizada sobre su enfermedad periodontal y la forma de prevenirla y evitar su progresión.

Además, la participación de cualquier persona en proyectos de investigación supone que se pueda conocer más sobre las enfermedades, nuevos tratamientos, medidas de prevención,

etc., que en definitiva contribuyen a la mejora de la sociedad como conjunto y es por esto que el equipo de investigación le estará muy agradecido no sólo en su nombre si no también en el del resto de pacientes y de la comunidad científica.

Es posible que al inicio o durante el curso del estudio, su enfermedad cambie o aparezca alguna otra patología nueva no relacionada de la que usted tendrá que hacerse responsable. Sólo los tratamientos directamente relacionados con este estudio serán gratuitos para usted, si bien existen gran cantidad de ellos que se realizan en la Facultad de Odontología a precios reducidos.

8.2. ¿Se me pagará por participar en el estudio?

No, a usted no se le pagará por participar en el estudio.

8.3. ¿Puede alguien hacer negocio con los resultados de este estudio?

Es posible que, como resultado de este estudio, en parte, se puedan desarrollar nuevos métodos diagnósticos o terapéuticos en un futuro que serán protegidos por las correspondientes patentes a través de la Universidad de Granada.

9. ¿CÓMO SE TRATARÁ LA INFORMACIÓN RECOPIADA?

9.1. ¿Cómo se protegerá mi privacidad?

Para mantener su privacidad, todos los procedimientos se realizarán de forma privada en un ambiente clínico de total confidencialidad.

Todos los datos recopilados durante el desarrollo del estudio serán incorporados en una base de datos anonimizada en formato electrónico protegida por contraseña en un ordenador de sobremesa (no portátil) también protegido mediante contraseña. Ambas contraseñas serán conocidas sólo por el investigador responsable del estudio y los miembros del equipo. Como regla fundamental, los números de identificación personal y su correspondiente número de identificación en el estudio sólo serán almacenados en un archivo físico guardado bajo llave sólo accesible al investigador principal. En caso de necesitarse cualquier tipo de intercambio de información de forma electrónica, sólo se realizará mediante sistemas encriptados y nunca conteniendo ningún tipo de dato de identificación personal.

9.2. ¿Qué información será compartida con otros investigadores? ¿Por qué?

Al firmar este documento, usted autoriza al investigador responsable del estudio para que pueda requerir información sobre su salud, en especial en lo referente a su enfermedad coronaria, con el su equipo cardiológico. Esto es así para evitar duplicidades en técnicas diagnósticas y obtener la mayor información posible, primero, para poder darle una mejor atención y, segundo, para obtener resultados más exactos al final del estudio.

Los resultados de este estudio se podrán publicar artículos científicos en revistas especializadas y/o presentados en reuniones científicas o conferencias públicas. En ninguno de estos casos se empleará información individual de ningún paciente concreto si no los valores numéricos obtenidos tras los análisis matemáticos de los mismos.

9.3. ¿Qué pasará con mi información si decido dejar el estudio o cuando éste termine?

Como regla general, si deja el estudio no se usará la información obtenida de usted pero es posible que sea mantenida hasta que sea destruida de forma segura. En cualquier caso, toda esta información será mantenida de forma segura siguiendo los protocolos de protección de datos y privacidad del paciente establecidos por la Universidad de Granada. Si este lo desea, esta información será destruida inmediatamente para lo que deberá ponerse en contacto con el investigador responsable por las vías indicadas en la sección 10.

10. ¿CUÁL ES LA INFORMACIÓN DE CONTACTO SOBRE EL ESTUDIO?

Usted puede contactar al investigador responsable para obtener más información sobre el estudio, preguntas sobre los procedimientos o tratamientos realizados durante el estudio, ante cualquier eventualidad, enfermedad, lesión o cualquier otro problema de salud, para abandonar el estudio antes de que finalice o por cualquier otro motivo que considere oportuno.

Investigador Responsable: Dr. Miguel Padial Molina

Dirección: Colegio Máximo, Campus Universitario de Cartuja, S/N, C.P. 18071 (Granada)

Teléfono: 958249032

Correo electrónico: mipadial@ugr.es

11. ¿QUÉ DOCUMENTOS SE ME ENTREGARÁN TRAS ESTA VISITA?

Su firma en la sección siguiente significa que usted ha recibido una copia de este documento completo.

12. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

D./Dña. con D.N.I. no..... y fecha de nacimiento/...../.....

Declaro que:

1. He leído (o me han leído) la hoja de información al paciente del proyecto titulado "Periostin y enfermedad periodontal como modificadores de enfermedad coronaria por aterosclerosis".

2. He comprendido la investigación que se va a realizar con mi participación y he tenido la oportunidad de resolver cualquier duda al respecto.

3. Asimismo, se me ha informado de que:

- Se hace constar que el participante manifiesta expresamente decir la verdad en sus respuestas para garantizar los datos reales sobre su estado físico o salud o los que se le solicitan (art. 23.1. L.I.B.).

- Tengo derecho a no otorgar mi consentimiento a participar y a revocarlo en cualquier momento del estudio (art. 4.3. L.I.B.).

- La falta de consentimiento a iniciar el estudio o su revocación una vez iniciado no me supondrá perjuicio alguno (en cualquier otro derecho) o discriminación (art. 4.4 y 6. L.I.B.).

- Seré informado, si así lo deseo, de los datos que se obtengan durante la investigación (art. 4.5 y 27.2. L.I.B.) y de la forma de obtener dicha información (art. 15.2. L.I.B.).

- Tengo derecho a decidir que no se me comuniquen los datos de la investigación (con las excepciones legales pertinentes) (art. 4.5. L.I.B.).

- Los datos que se obtengan con mi participación en la investigación son anónimos y si al publicarlos hay que mencionar mi nombre será precisa mi autorización (art. 15.2. L.I.B.). Los datos recogidos en esta investigación serán anónimos y su uso se regirá por lo recogido en la legislación vigente en relación a la Protección de Datos de Carácter Personal. Mis datos personales serán tratados conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, pudiendo ejecutar en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndome en contacto con el investigador principal según los datos incluidos en el documento de información al participante.

4. Acepto participar de forma voluntaria en el proyecto arriba mencionado.

Firma del participante

Lugar y fecha

10.D. Publicación científica

Con el fin de evitar conflictos de copyright, aunque el artículo se publicó en acceso abierto, no se incluye el documento en pdf generado por la revista sino la versión final aceptada para publicación.

PERIOSTIN IN THE RELATION BETWEEN PERIODONTAL DISEASE AND ATHEROSCLEROTIC CORONARY ARTERY DISEASE: A PILOT RANDOMIZED CLINICAL STUDY

Miguel Padial-Molina 1,2, Gloria Gonzalez-Perez 3, Natividad Martin-Morales 1,2,4,5, Elena Sanchez-Fernandez 1,2, Francisco O'Valle 2,5,6, Pablo Galindo-Moreno 1,2.

1 Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain.

2 Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain.

3 PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada.

4 PhD Program in Biomedicine, University of Granada.

5 Department of Pathology, School of Medicine, University of Granada.

6 Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER, CIBM), University of Granada.

Running title: Periostin, periodontal disease and atherosclerosis.

MeSH key words: Periostin; Periodontal disease; Atherosclerosis; Coronary heart disease; Periodontal therapy; Extracellular matrix.

Corresponding author:

Miguel Padial-Molina

School of Dentistry, University of Granada

Campus Universitario de Cartuja, s/n

18071, Granada, Spain

Phone: (+34) 958 249032

Email: mipadial@ugr.es

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Funding

This investigation was partially supported by Research Groups #CTS-138, #CTS-1028 (Junta de Andalucía, Spain), and by the Andalucía Talent Hub Program from the Andalusian Knowledge Agency, a program co-funded by the European Union's Seventh Framework Program, Marie Skłodowska-Curie actions (COFUND – Grant Agreement n° 291780) and the Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the Junta de Andalucía.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest, either directly or indirectly, in any of the products listed in the manuscript.

Ethical aspects

All procedures performed in studies involving data from human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Written informed consent for this randomized clinical study was obtained from each patient before any study procedures were initiated. The protocol was previously approved by the Ethics Committee on Human Research from the

University of Granada on January 27th, 2015, and was registered with number 937. Additionally, the protocol was registered in a WHO and ICMJE approved registry with the code ISRCTN17884414 (<https://doi.org/10.1186/ISRCTN17884414>).

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to analyze the effects of periodontal treatment on markers of atherosclerotic coronary artery disease and circulating levels of periostin.

Background: Periostin is necessary for periodontal stability, but it is highly present in atherosclerotic plaques. Treatment of periodontal disease, with low levels of local periostin, is thought to reduce systemic levels of periostin. Thus, this may contribute to cardiovascular health.

Methods: A pilot randomized controlled-clinical trial was designed to include patients with severe periodontal disease and history of atherosclerotic coronary artery disease. Samples of gingival crevicular fluid (GCF) and serum were collected before and after periodontal treatment by periodontal surgery or non-surgical therapy. The levels of several markers of inflammation and cardiovascular damage were evaluated including CRP, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, MIP-1 α , periostin and TNF- α in GCF and CRP, Fibrinogen, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, L-Selectin, MIP-1 α , Periostin, TNF- α , and vWF in serum.

Results: A total of 22 patients with an average of 56 years old were recruited for participating in this study. Twenty of them were male. Most of them (82%) had suffered an acute myocardial event and underwent surgery for placing of 1, 2 or

3 stents in the coronary arteries more than 6 months ago but less than 1 year. The treatment of periodontal disease resulted in an overall improvement of all periodontal parameters. Regarding the evaluation of GCF and serum, a significant increase of periostin in the GCF was observed after periodontal surgery. In contrast, although other markers in GCF and serum improved, no significant correlations were found.

Conclusion: Treatment of periodontal disease through periodontal surgery induces a local and transient increase in the levels of periostin in the gingival crevicular fluid. The effects on systemic markers of inflammation and cardiovascular function have not been confirmed.

INTRODUCTION

Periodontal diseases are chronic localized infectious and inflammatory diseases that affect the periodontium. Severe or moderate forms affect 45-84% of adults in the European Union (EU) and are the main cause of tooth and bone loss (1). The worldwide prevalence has remained stable in the last 30 years (2,3). On the other hand, cardiovascular diseases (CVD) are the largest cause of death in the EU, accounting for 40% of deaths or 2 million per year. CVD are estimated to cost the EU economy almost EUR 110 billion a year, and they are one of the leading causes of long-term sickness and loss to the labor market (CVD Statistics). Atherosclerotic cardiovascular diseases (ACVD), specifically, are due to the generation of an atheroma plaque in the wall of any artery with fatal consequences in the coronary arteries (CAD). ACVD and periodontal disease have been associated in numerous epidemiological and interventional studies (4-9). However, their specific biological interactions are yet to be fully understood.

Inflammation plays a determinant role in both diseases (10,11). Periodontal disease is initiated by the ecologic succession of the dental plaque that triggers

a host immune and inflammatory response. Additional to genetic and environmental common risk factors, periodontal diseases result in bacteremia and endotoxemia that produce direct effects on platelet aggregation, endothelial damage by crossed autoimmune responses, macrophage and endothelial cell invasion, and endocrine effects on vascular tissues by pro-inflammatory mediators (12). Thus, periodontal diseases are known to increase the risk for ACVD and, subsequently, also correlate with infarct size (13).

The maintenance of periodontal tissues is the result of a sensitive balance. Matricellular molecules, such as periostin, play a determinant role in this. Periostin (gene POSTN) is a 90 kDa, 835 aminoacids protein highly expressed in the periosteum (14). In the oral cavity, periostin is highly specific for the periodontal ligament (PDL) and essential for its homeostasis (15). Its expression is regulated by mechanical stimulation through TGF- β 1. Periostin interacts with collagen to increase its cross-linking, fiber diameter and, therefore, tissue mechanical strength. It has been used as a marker of periodontal functionality after regeneration processes (16,17) and it is known to increase cell migration and proliferation (18,19). However, the expression of periostin is reduced in vitro by periodontal bacteria and pro-inflammatory cytokines (20). In vivo, in the presence of periodontal disease, its expression is reduced and contributes to the progression of the inflammatory infiltrate and alveolar bone destruction (21). Interestingly, it is fibrillary distributed in healthy human tissues while it is diffuse in diseased tissues (15). These effects suggest a protective role of periostin in periodontal disease pathogenesis while its reduction constitutes a concomitant cumulative effect for disease progression. Interestingly, after periodontal surgery, levels of periostin increase in gingival crevicular fluid (GCF) and decrease in serum (15). This inverse effect is explained by the fact that periostin increases locally by PDL cells to promote tissue healing and restore the structure and

function. At a systemic level, however, periostin is associated with fibrotic and inflammatory processes, such as asthma, allergy and kidney inflammatory diseases (22,23). Therefore, the reduction of circulating periostin after periodontal surgery could help to reduce the negative effects on distant tissues.

In the cardiovascular system, periostin is required during cardiac development (14). Adult heart, however, does not show high levels of periostin. These levels of periostin only increase after acute events, fibrotic remodeling, and cardiomyocyte senescence (24). This is, periostin has been referred to as a “heterofunctional regulator of cardiac development and disease” (25) as it is necessary for tissue development but it becomes pathologic if maintained. As a consequence, high serum levels of circulating periostin have been detected after acute myocardial infarction (26) and are associated with reduced cardiac function and increased risk of new cardiac events (27). Furthermore, periostin is also increased in atheroma plaques (28) and it has been associated to their maturation by calcification (29). It additionally contributes to atherogenesis by increasing smooth muscle cell migration, angiogenesis and MMPs production and increases the risk of CAD (30).

The relevance of periostin in periodontal disease and CAD and the plausibility of the proposed biological interaction should, therefore, be investigated. Thus, we hypothesized that periodontal treatment improves systemic biomarkers of atherosclerotic coronary artery disease in association with a reduction of circulating levels of periostin and an increase of local periostin in the gingival crevicular fluid. So, our overall goal was to evaluate the effects of periodontal treatment on atherosclerotic coronary artery disease based on the reduction of circulating periostin. In addition, to analyze which could be a sufficient therapy, a randomized controlled clinical trial was design to perform either a localized

periodontal surgery combined with full-mouth non-surgical therapy, or only full-mouth non-surgical periodontal therapy.

MATERIAL AND METHODS

Study design and settings

We used the CONSORT checklist when writing our report (31).

To achieve the goals of the study, a randomized controlled clinical trial was conducted in patients with periodontal disease and atherosclerotic coronary artery disease. They received either localized periodontal surgery (PS) on the worst quadrant and non-surgical therapy (NST; scaling and root planning) on the rest of the mouth or only a session of full-mouth NST. Both groups were followed-up at 2 weeks, 1 month, 3 months and 6 months post-intervention. Before any procedure was initiated, all patients were informed of the aims, procedures, risks, benefits, rights, and responsibilities associated with the study and provided their voluntary signed informed consent. Recruitment of patients was performed at the Cardiovascular Clinic of the Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain) and the School of Dentistry - University of Granada (Spain), while periodontal treatment and sample evaluation was conducted at the School of Dentistry - University of Granada and the Centre for Biomedical Research - University of Granada, respectively. All procedures were conducted under the supervision of the Ethics Committee on Human Research of Granada (Junta de Andalucía, Spain) (registration number 0296-M1-16) and the Ethics Committee on Human Research of the University of Granada (registration number 937). The study was registered at the International Standard Randomized Controlled Trial Number site (registration number ISRCTN17884414).

Study population

As a pilot study, and based on our previous studies (15), a total of 10 patients per group were considered necessary to detect significant changes in periostin over time after periodontal treatment. To be included in the study, patients had to be under 75 years old with atherosclerotic coronary artery disease defined as more than 50 % blockage of a coronary artery or recent coronary event (6-36 months before), including myocardial infarction, coronary bypass, or stent. They also have to present what is currently classified as localized or generalized Stage III, Grade B periodontal disease (32). In any case, at least one quadrant had to be susceptible for periodontal surgery due to more than 30 % of teeth with more than 6mm of probing depths. Exclusion criteria included additional coronary event less than 6 months before enrolment, renal failure (creatinine higher than 1.5 mg/dL), uncontrolled liver or pulmonary disease, malignant tumor, autoimmune disease, neurologic or psychiatric disorder, uncontrolled diabetes mellitus (HbA1c higher than 8), presence of infectious disease (aside from periodontal), antibiotic or periodontal therapy 3 months before, alcoholism or drug abuse, other on-going oral condition (orthodontic treatment, caries, etc.), any other contraindication for treatment or unwilling or unable to provide informed consent and participate in the study. After inclusion, patients would be secondarily excluded if periodontal disease progression of more than 2 mm at the 3 months re-evaluation, (re)infarction, or cardiovascular (re)intervention, were observed.

Randomization and study procedures

After enrolment, patients were randomized to a control group (NST) or intervention group (PS). Randomization was performed by using the software Minimpy (33) to balance age, gender and smoking status. Patients assigned to the NST group received a full mouth supragingival tooth cleaning and scaling and root planning. Patients in the PS group received surgical treatment of periodontal

disease by access flap or modified Widman flap and bone surgery (to smooth shallow boney craters), if required (34). If more than one quadrant was susceptible to receive periodontal surgery, it was conducted only in the more severe one. In both cases, the provider was the main author of the study (MP-M). Sutures were removed 7 days later. Post-surgical and oral hygiene instructions were provided in all cases, including recommendation for analgesics if required and chlorhexidine mouth rinse for 15 days.

Data collection

A complete oral and medical history was recorded, including age, gender, maximum level of study, smoking status, diabetes, type and time since the cardiovascular event, weight, height, body mass index (BMI), resting blood pressure, and glycemia. An oral and periodontal exam was performed by an experienced provider (GG-P) at baseline, 3 and 6 months, including probing depth (PD), gingival recession (GR), clinical attachment level (CAL) (all in mm), and bleeding on probing (BOP, dichotomous) in 6 sites per tooth. Additionally, Löe's gingival (GI) and plaque indexes (PI) (35) were also registered in 4 sites per tooth. After treatment, wound healing (WHI) was registered as: 0=Mature wound healing; 1=Erythema; 2=Spontaneous bleeding; 3=Flap mobility; 4=Suppuration; and 5=Necrosis (36). In addition, patients registered overall pain in a 100 mm scale from 0 (no pain at all) to 100 (maximum pain imaginable). WHI and pain were registered only for the 1-, 2- and 4-weeks post-baseline visits.

Sample collection and analysis

At baseline, 2 weeks and 3 and 6 months, gingival crevicular fluid (GCF) and serum were collected. Levels of periostin in GCF and serum after periodontal treatment are considered the primary variables of the study while levels of other markers are secondary variables.

Gingival Crevicular Fluid (GCF)

For GCF collection, we followed the same methodology used previously by our group (15). Briefly, to avoid contamination, before any periodontal measurement was conducted, the area with the 3 sites with the deepest PD, as determined in the screening visit, were isolated with cotton rolls, air-dried, tooth plaque removed and a GCF paper strip carefully inserted in the sulcus for 30 seconds. Then, the strip was retrieved and immediately stored at -80°C until assayed. Fluid extraction from the strip consisted in 5 sequential washes with 20 µl of a PBS solution containing PMSF (1:200), aprotinin (1:100) and human albumin (30%) that were spun at 2000 rpm, 4°C, 5min each. The final volume (100 µl) was stored at -80°C until analysis.

Serum

Peripheral venous blood was extracted and collected into BD Vacutainer® blood collection tubes, and immediately separated in plasma and serum by spinning for 10 min at 2700 rpm. Serum was collected and stored at -80°C until assayed.

Biomarker determination

Sample processing and biomarker determination was conducted by a blinded study member (NM-M). Once the samples from both GCF and serum were prepared and ready to be analyzed, the concentration of each marker of interest was quantified by using an ELISA-type multiplex assay based on Luminex® xMAP® magnetic beads technology (EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP, Merck, Darmstadt, Germany). We used 3 different personalized kits for the different groups of markers to be analyzed: cytokines (HCYTOMAG-60K: IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, MIP-1 α , TNF- α), markers related to cardiovascular health (HCVD3MAG-67K: CRP, Fibrinogen, L-Selectin, vWF) and periostin (HCMBMAG-22K). CRP, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, MIP-1 α , periostin and TNF- α were evaluated in GCF while CRP, Fibrinogen, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, L-Selectin, MIP-1 α , Periostin, TNF- α , and vWF

were evaluated in serum. The assay for periostin has a sensitivity of 0.12 ng/ml and no cross-reactivity, according to the manufacturer.

At the manufacturer recommendations, after the preparation of the reactants necessary in the analysis (microspheres with immobilized antibodies, washing buffer, standards) the assay procedure was initiated. The 96 wells of the plate provided by the kit were previously washed with the wash buffer, and then the standards were added to the appropriate wells. Subsequently, the test buffer and the matrix solution (if required depending on the type of kit) were added in the appropriate wells. Then, the GCF or serum samples were added (with the appropriate dilutions following the manufacturer recommendations) and then the magnetic microspheres. The plates were incubated at 4°C throughout the night and after that, the detection antibodies were added. After one hour of incubation at room temperature, streptavidin-phycoerythrin was added, the plate was incubated for 30 minutes at room temperature and several plate washes were performed. Finally, the reading buffer was added, and the plate was read in a Luminex 200 device that measures the fluorescence of each well. The concentration of each marker was calculated against the standard curve. Each sample was analyzed in duplicate.

Statistical analysis

IBM SPSS-MacOS 28.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for the analyses. Results are presented as mean (standard deviation) for continuous variables and as percentage (frequency) for categorical data. Given the limited sample size, all comparisons were evaluated by non-parametric tests. Differences between groups were investigated by the Independent Samples Mann-Whitney U Test; differences over time within each group were analyzed by the Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks and pairwise comparisons further evaluated applying the Bonferroni correction for multiple tests.

Correlations between variables were evaluated by calculating the p value for the Spearman's rank correlation coefficient. Differences were considered statistically significant when p values were below 0.05. Graphics were constructed on Microsoft® Excel for Mac v16.76 and Prism 7 for Mac.

RESULTS

Study population

A total of 878 patients were pre-screened from either direct interview during follow-up at the Cardiovascular Clinic of the Hospital Virgen de las Nieves or clinical records review at the School of Dentistry – University of Granada. From those, 835 did not meet the inclusion criteria, 3 declined to participate while 4 were being treated for other pathologies. Thus, 36 patients were fully screened for potential inclusion. Only 22 were randomized, 11 to each group, because 13 did not meet the inclusion criteria and another one did not show to the baseline visit. All patients included were followed for the whole duration of the study. A flow diagram of patients in the study is presented in **Figure 1**.



CONSORT

TRANSPARENT REPORTING of TRIALS

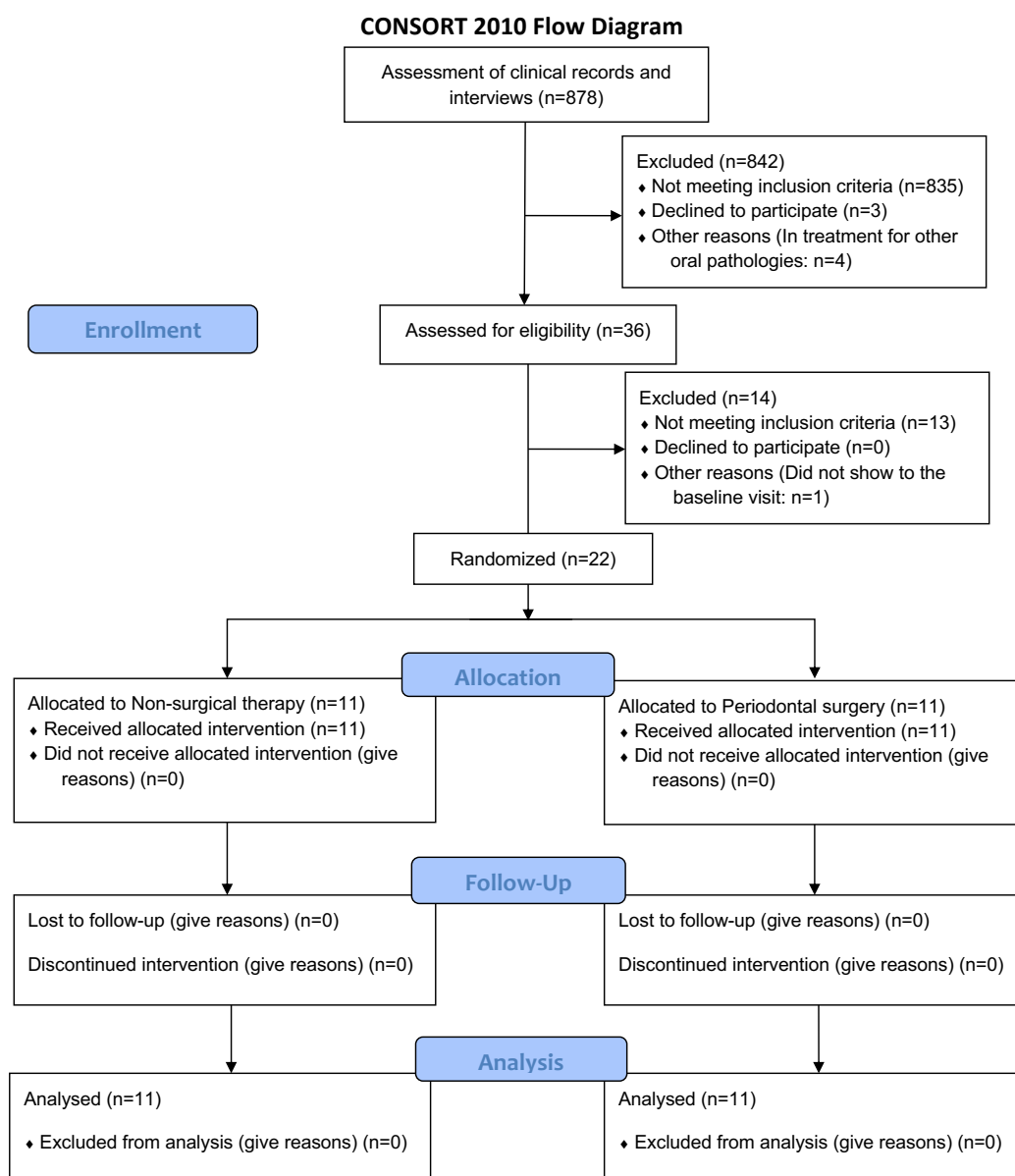


Figure 1: Flow diagram of patients in the study.

Demographics and clinical basic data of randomized patients is presented in **Table 1**. As noted, no statistically significant differences were detected between groups for any variable except for diabetes. All 6 patients with diabetes were

assigned to the PS group. Most patients were men in their mid-fifties, overweighted, with high school or lower education level, former smokers, who had suffered an acute myocardial infarction that made them go under surgery for placement of a stent in any of the coronary arteries less than a year before.

Table 1: Characteristics of patients included in the study.

	Total - n=22	NST - n=11	PS - n=11	P value*
Age (years)				
Mean	56.32	57.73	54.91	0.300
Range	45-68	45-68	48-65	
Gender (n (%))				
Male	20 (90.91)	10 (90.91)	10 (90.91)	1.000
Female	2 (9.09)	1 (9.09)	1 (9.09)	
Education level (n (%))				
Less than high school	15 (68.18)	10 (90.91)	5 (45.45)	0.069
High school	6 (27.27)	1 (9.09)	5 (45.45)	
More than high school	1 (4.55)	0 (0.00)	1 (9.09)	
Smoking status (n (%))				
Never Smoked	4 (18.18)	2 (18.18)	2 (18.18)	0.054
Former (<10 cigarettes)	4 (18.18)	4 (36.36)	0 (0.00)	
Former (>10 cigarettes)	11 (50.00)	3 (27.27)	8 (72.73)	

Current (<10 cigarettes)	3 (13.64)	2 (18.18)	1 (9.09)	
Diabetes (n (%))				
No	16 (72.73)	11 (100.00)	5 (45.45)	0.004
Yes	6 (27.27)	0 (0.00)	6 (54.55)	
Cardiovascular event (n (%))				
AMI	3 (13.64)	1 (9.09)	2 (18.18)	0.459
AMI + Stent	18 (81.82)	10 (90.91)	8 (72.73)	
Stent	1 (4.55)	0 (0.00)	1 (9.09)	
Time since cardiovascular event (n (%))				
>6 months - ≤1 year	18 (81.82)	10 (90.91)	8 (72.73)	0.121
>1 year - ≤2 years	3 (13.64)	0 (0.00)	3 (27.27)	
>2 years - ≤3 years	1 (4.55)	1 (9.09)	0 (0.00)	
Weight (kg) (mean (SD))	79.55 (14.50)	75.27 (12.63)	83.82 (15.55)	0.270
Height (cm) (mean (SD))	167.32 (8.46)	168.09 (6.91)	166.55 (10.07)	0.898
BMI (mean (SD))	28.34 (4.25)	26.57 (3.99)	30.10 (3.89)	0.056

*: p value (NST vs. PS): Independent Samples Mann-Whitney U Test for continuous variables; Chi-square for categorical variables.

Note: AMI=Acute myocardial infarction; BMI=Body mass index.

Status and evolution of periodontal and atherosclerotic disease after treatment

Full-mouth average clinical attachment level was not statistically different between groups at any time point. More than 50 % of sites had more than 5 mm of calculated CAL at baseline, while only 30.88 (26.75) % and 38.06 (32.49) % at 6 months presented that measure or above in the NST and PS groups, respectively ($p=0.898$ and $p=0.905$, baseline and 6 months, respectively; Independent Samples Mann-Whitney U Test). The change over time was significant in both groups ($p<0.001$, Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks) when comparing the baseline data against the 3 or 6 months but not between 3 and 6 months (Bonferroni correction for multiple comparisons). In all cases, probing depth decreased from 21.32 (15.11) % of sites with more than 6 mm in the NST group and 17.89 (11.30) % in the PS group at baseline ($p=0.606$, Independent Samples Mann-Whitney U Test) to 1.97 (3.44) % and 1.71 (1.73) % at 6 months ($p=0.604$, Independent Samples Mann-Whitney U Test). The change over time was statistically significant ($p<0.001$, Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks) and, again, specifically when comparing the baseline data against the 3 or 6 months but not between 3 and 6 months (Bonferroni correction for multiple comparisons). FGM and PD data is represented in **Figure 2**. Although overall CAL change from baseline to either 3 or 6 months was not statistically different between groups, the difference in PD reduction from baseline to 3 months was statistically significant (1.18 (0.67) mm vs. 1.41 (0.59) mm; NST vs. PS, respectively; $p<0.001$, Independent Samples Mann-Whitney U Test). Accordingly, sites with positive BOP decreased from 39.60 (29.65) % and 42.90 (23.88) % at baseline to 1.48 (3.12) % and 0.00 (0.00) % at 6 months (NST and PS, respectively). Differences in BOP were not statistically significant between groups but were significant over time. Similarly, differences in both PI and GI were not statistically significant between groups but were significant over time (**Supplementary Figure 1** and

Supplementary Figure 2). No differences were detected between groups in any other periodontal variable, except WHI at 7 days.

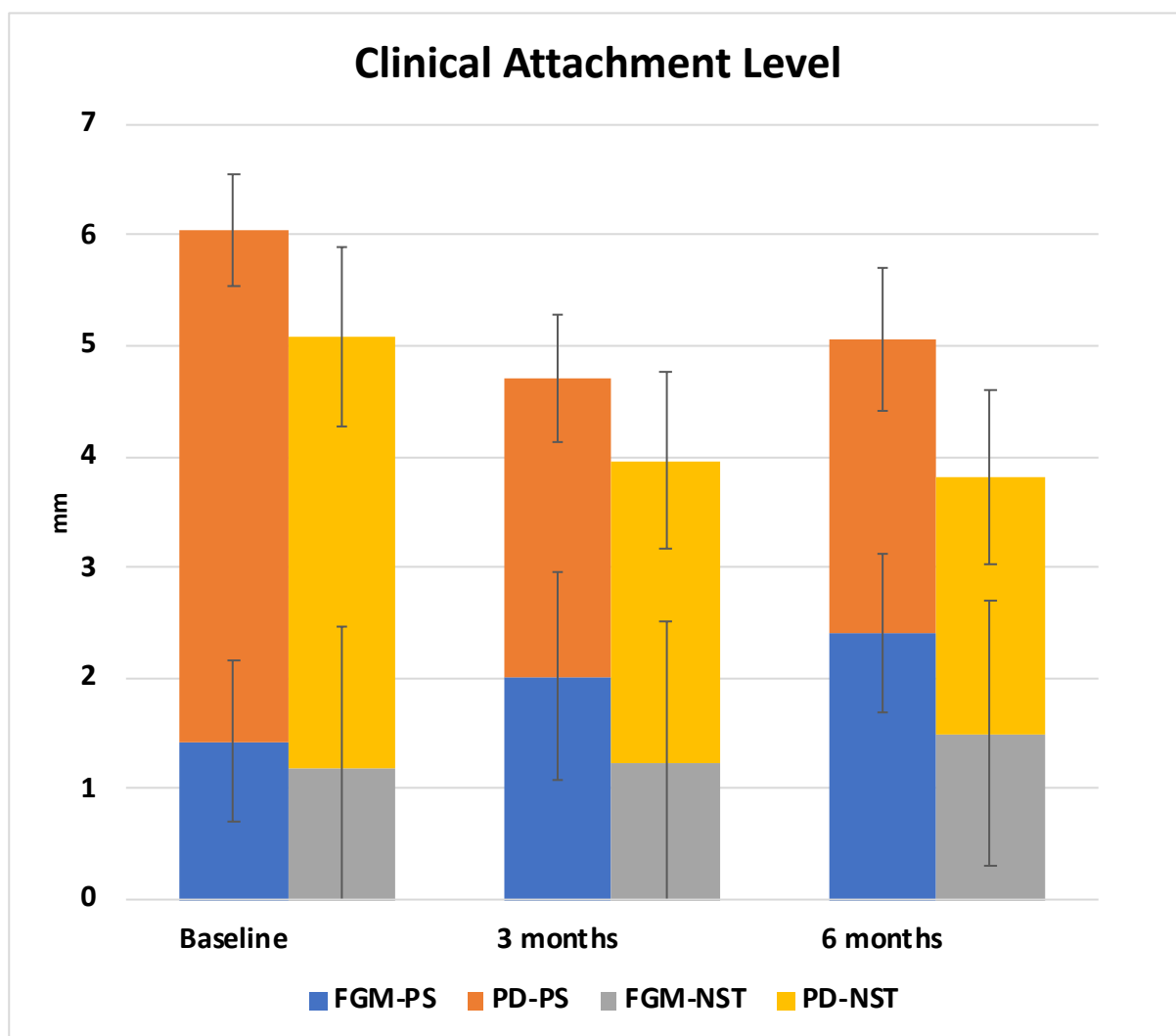


Figure 2: Graphical representation of CAL as a piled composition of FGM and PD over time.

All periodontal data, WHI and pain over time is available in **Supplementary Tables 1-3**.

Regarding other cardiovascular parameters such as blood pressure and glycemia, no differences were observed neither between groups nor over time (**Supplementary Table 4** and **Supplementary Figure 3** and **Supplementary Figure 4**).

Biomarkers in gingival crevicular fluid and serum

The levels of all biomarkers in the GCF and the statistical comparisons, both between groups and over time, are summarized in **Supplementary Table 5** and graphically represented in **Figure 3**. Similarly, the analyses in serum are presented in **Supplementary Table 6** and **Figure 4**.

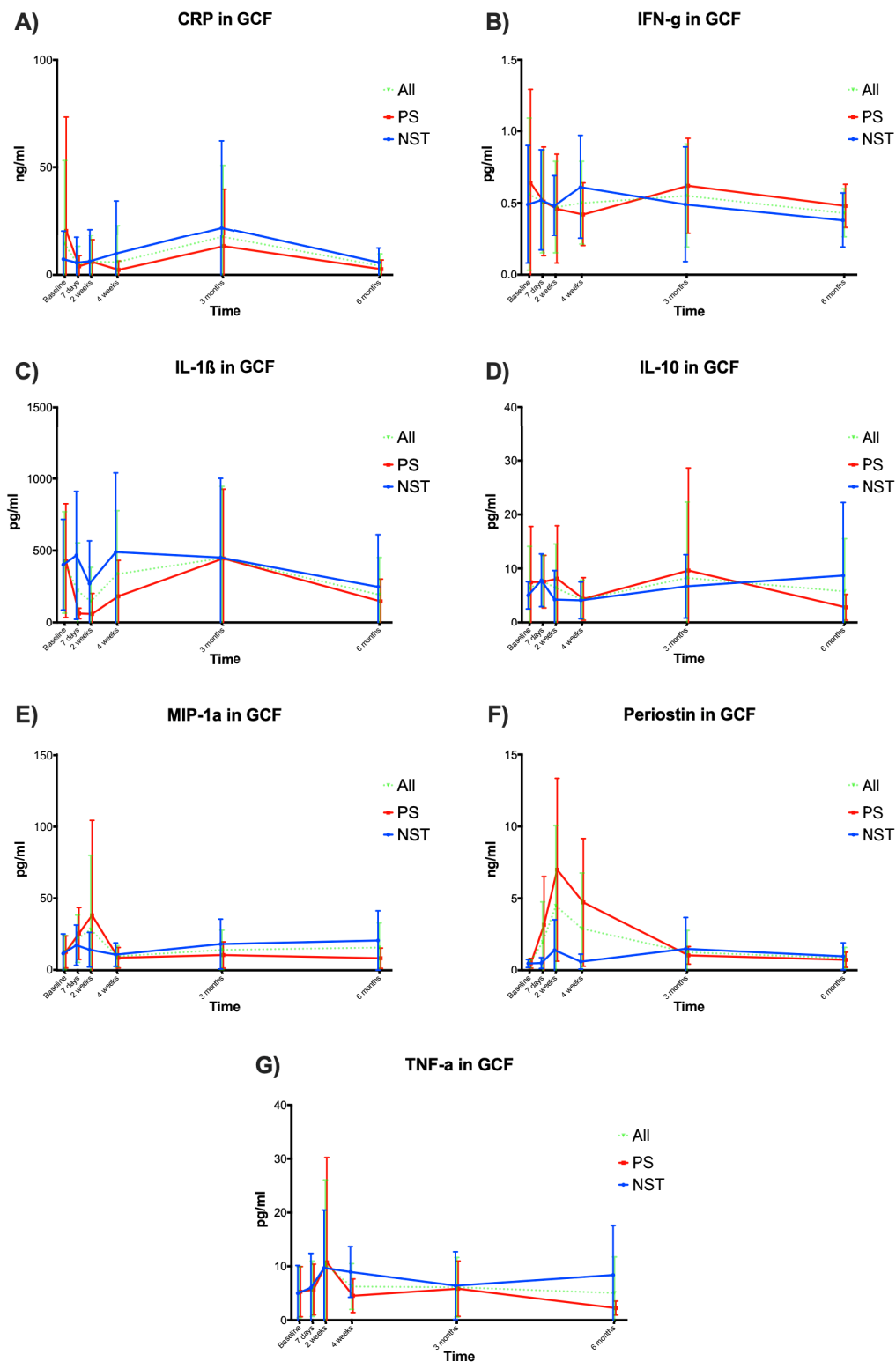


Figure 3: Graphical representation of the different markers analyzed in the GCF over time, including A) CRP, B) IFN- γ , C) IL-1 β , D) IL-10, E) MIP-1 α , F) periostin and G) TNF- α .

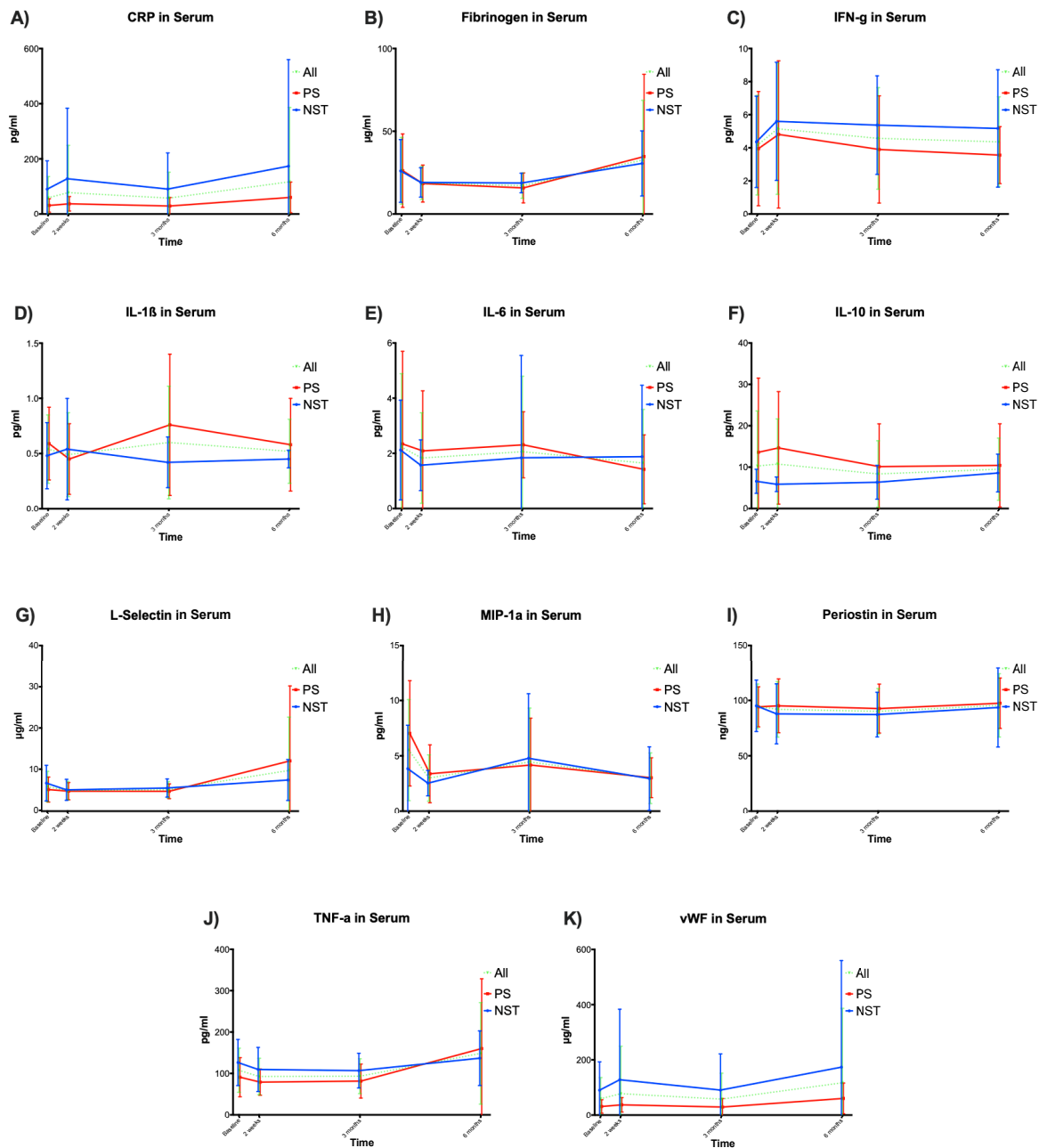


Figure 4: Graphical representation of the different markers analyzed in serum over time, including A) CRP, B) Fibrinogen, C) IFN- γ , D) IL-1 β , E) IL-6, F) IL-10, G) L-Selectin, H) MIP-1 α , I) Periostin, J) TNF- α , and K) vWF.

The levels of periostin in the GCF of patients with periodontitis who underwent surgery increased significantly over time ($p=0.019$, Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks) and with respect to the group who received non-surgical therapy. Specifically, the concentrations of periostin at 1, 2

and 4 weeks after surgery were significantly higher in the PS group compared to the NST group (0.5 (0.38) vs. 3.16 (3.36) ng/ml, 1.4 (2.12) vs. 6.99 (6.36) ng/ml, and 0.6 (0.52) vs. 4.72 (4.44) ng/ml; $p=0.010$, $p=0.007$ and $p<0.001$, respectively). Serum levels of periostin, on the other hand, did not vary significantly over time, nor between groups. Analysis of this primary outcome confirmed that the statistical power reached was low.

The concentrations of cytokines and chemokines characteristic of the inflammatory process in periodontal disease and atherosclerosis showed no significant differences either over time or between the two groups. This was observed both in GCF and in serum.

Regarding specific markers of atherosclerotic disease and cardiovascular health, including CRP, fibrinogen, L-selectin and vWF, we found no significant differences neither over time nor between groups.

Finally, the analysis of possible correlations between the different biomarkers analyzed and clinical data showed no clear trend; isolated significant correlations were found though.

DISCUSSION

This study was designed to evaluate a possible reduction of periostin levels in serum associated to increased periostin in the GCF because of periodontal treatment. A temporary significant increase of local periostin levels was observed after surgical treatment of periodontal disease. A reduction of some markers associated with periodontal and atherosclerotic disease (e.g., IL-6, MIP-1 α , and TNF- α), particularly in the group who received periodontal surgery, was observed although the differences were not statistically significant. The importance of this study with respect to previous studies that analyzed how periostin levels vary in periodontal disease lies in the inclusion of patients who present, in addition to periodontitis, atherosclerotic disease of the coronary arteries. Only a previous

cross-sectional study has studied patients with both diseases and has found a potential role of periostin in the association (37).

Levels of periostin in the GCF of sites with periodontitis are significantly lower than in sites with gingivitis and periodontal health (38). Periostin has been particularly proposed as a marker of susceptibility and activity of periodontal disease because it negatively correlates with the clinical parameters indicative of periodontal health (39-41). In the presence of systemic diseases such as diabetes, levels of periostin in the GCF in cases of periodontal disease are even lower (42). Our group made important contributions to the understanding of this association in a number of in vitro, animal and clinical studies (15,18-21). In summary, factors associated to periodontal disease, such as inflammation and bacterial byproducts, can reduce the expression of periostin by periodontal ligament fibroblasts. Consequently, cell migration and extracellular matrix organization are impaired. Aggressive forms of periodontal disease demonstrate even lower levels of periostin, which confirms the double role in the maintenance of periodontal structure (40,43). These are: 1) periostin is essential for maintaining the strength of the periodontal structure; 2) if periostin is reduced either by the action of inflammation or bacterial byproducts, the tissue destruction is initiated. Fortunately, periodontal therapy has been shown to promote an increase in those levels of periostin in the GCF (15,44,45). This transient increase would serve as a booster for cell migration and extracellular matrix organization. Once the healing is finalized, periostin levels should go back to the levels of a healed site; this is, higher than in disease. In the current study, although other markers of inflammation and tissue destruction have followed a non-regular pattern and statistical differences have not been clearly demonstrated, the behavior of periostin in the GCF has followed the same pattern as described in the

aforementioned studies. This confirms, once more, its role in periodontal disease, therapy, and healing.

In contrast, the levels of periostin that are released to the surroundings and reach systemic areas follow the opposite scheme: periostin detection is higher in the saliva of patients with periodontal disease, even higher if the periodontal disease is an aggressive form (40). More distantly, beside the finding of periostin in atheroma plaques (28), an animal study has found that periostin knock-out mice did not develop aortic atherosclerotic plaque lesions as big as wild-type mice (46). Furthermore, macrophage recruitment, extracellular matrix organization, and fibrotic caps were reduced in the absence of periostin while MMP-2 and MMP-13 were increased. Overall, the authors proposed therapeutic reduction of periostin as a potential target for the treatment of atherosclerotic plaques.

Thus, although the levels of periostin in serum are not different between different periodontal conditions (41), according to a previous study, after periodontal surgery, levels of periostin decrease in serum following a similar transient pattern as the increase in the GCF (15). This was hypothesized as an indication of a reduction of the release of periostin from the local periodontal surgical site to the systemic blood circulation. As a consequence, due to the heterofunctional aspect of periostin in health and disease (22,25,47,48), those sites where periostin would induce a negative effect, such as an atheroma plaque, would benefit from this reduction of periostin after the periodontal therapy. However, in the current study, no significant changes between groups at the different time points nor over time were detected. These results indicate that there might be no systemic influence of periodontal surgery on the expression of periostin in patients with periodontitis and atherosclerosis, since its levels do not change in serum, in contrast with those observed in a previous study (15). Even more, unfortunately, in the current study, we have not been able to demonstrate changes in other

markers nor any correlation with the levels of periostin, neither in the GCF nor in serum.

Together with periostin, we have evaluated CRP, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, MIP-1 α , and TNF- α in GCF, and CRP, Fibrinogen, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, L-Selectin, MIP-1 α , TNF- α , and vWF in serum. Markers of inflammation such as CRP, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, MIP-1 α , and TNF- α have been shown to be associated with the adaptive and innate response. In turn, systemic levels of CRP, Fibrinogen, IL-6, L-selectin, TNF- α and vWF have been associated with atherogenesis, endothelial dysfunction and, thus, predictors of coronary artery disease (49). In the current study, although not significantly, some such as IL-6, MIP-1 α and TNF- α showed a reduction in serum over time after periodontal treatment. Particularly, IL-6 is directly related to myocardial damage in the chronic and not acute phase after infarction such as troponin (50). The observed reduction may indicate long-term benefit rather than immediate benefit. TNF- α is a widely known inflammatory mediator that plays a determining role in the regulation of cardiac contractility and peripheral resistance, the main determinants of myocardial function. Elevated levels have been associated with ischemia-reperfusion damage, myocarditis, and progression of congestive heart failure (51). Finally, high levels of MIP-1 α are associated with increased risk of new cardiovascular events independently with other risk factors as it increases the recruitment of monocytes to the zone of inflammation and may contribute to increased atheromatous plaque (52). Therefore, the observed reduction of these markers may indicate that periodontal treatment induces a systemic reduction of inflammatory markers and an improvement in the maintenance of overall cardiovascular health. For some of those markers, we observed differences at baseline, which could be related to other conditions not factored in the current study. Regardless, periodontal

disease might not influence systemic levels of cytokines in patients with acute coronary syndrome, as commonly thought (53).

In any case, although the direct effects of periodontal treatment on cardiovascular health and reduction of pro-atherogenesis markers through periostin, according to the current study, might not be strong enough, we must keep in mind the actions of periostin in the cardiovascular system as a whole. Particularly, periostin is necessary and highly expressed during cardiac development. In the adult heart it is not expressed at high levels but increases after acute events (54,55), reflecting fibrotic remodeling processes (56) and subsequent short-term loss of function (57). Thus, its use as a marker of the severity of cardiac damage has been suggested (27,58). It may contribute to generate vulnerability to acute myocardial infarction in cardiomyocytes (59) but it also induces the recruitment of cardiomyocytes to the infarcted area (47), showing that the balance between beneficial effects and low levels that shall prevent the fibrosis process is under study with conflicting results. It all seems to be dependent on the time after infarction (60). In atherosclerotic plaques periostin is increased (28) and contributes to atherogenesis (61) by increasing smooth muscle cell migration (62) and calcification (29), adventitial remodeling (63), and angiogenesis and MMP production (30), which increases the risk of atherosclerotic coronary heart disease (64). Thus, the goal would be to keep periostin high in the GCF associated to periodontal health that would be associated to a limited release to the system; in case of an acute atherosclerotic event, the low levels of periostin may help reduce the consequences of such event.

Certain limitations of this study could affect the results presented. Among them, the main one is the low number of individuals who participated in the study, which ultimately affected the statistical power to detect differences in the primary variable (differences in serum levels of periostin over time). However, the study

was designed as a pilot study because of the limited information in the specific hypothesis presented. In fact, the only study we know of in which the serum levels of periostin were evaluated after periodontal treatment had a similar sample size (15), and was, in fact, the base for the current study. Moreover, we must keep in mind that periodontal disease may induce severe alteration of the systemic inflammatory profile because of the continuous low-level inflammatory burden and bacteremia with higher defensive cell counts and an increased risk of systemic diseases, in comparison with healthy patients (65). However, cardiovascular diseases are highly multifactorial, and patients often suffer from other concomitant systemic pathologies and are undergoing chronic pharmacological treatments. This could be masking the reduction of the biomarkers we have evaluated in these patients. So much so that, although the influence of diabetes, for example, on serum periostin levels has not been specifically analyzed in the current study, there is biological plausibility for the existence of this relationship, similar to that shown by Morsy & Ali (42). In turn, diabetes influences cardiovascular disease by altering, among others, the normal healing capacity because of changes in the inflammatory capacities and control mechanisms. In this way, periostin could have a role in regulating both. Several studies show that diseases such as diabetes or obesity and habits such as smoking are related to periodontal disease affecting its progression and evolution while at the same time affects the cardiovascular system; the interaction between all of them ultimately modify the potential benefits on the cardiovascular health of treating periodontal disease (4-6). In addition, if we consider the type of treatment conducted in the current study, we must also mention a recent systematic review of reviews that concludes that the evidence regarding the impact of periodontal therapy on improvement of systemic diseases is not strong. In fact, it is concluded that the evidence and reviews frequently lack proper quality (66).

Regardless of these limitations, the current study, for the first time, makes an approximation to the biological plausibility of the interaction of periodontal and coronary artery diseases through the actions of periostin. Although the results might be inconclusive, they offer opportunities for future studies with higher sample size and wider biomarkers under study.

CONCLUSION

Treatment of periodontal disease through periodontal surgery induces a local and transient increase in the levels of periostin in the gingival crevicular fluid. The effects on systemic markers of inflammation and cardiovascular function have not been confirmed.

REFERENCES

1. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000. 2002;29(1):104-21.
2. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res*. 2017;96(4):380-7.
3. Peres MA, Macpherson LM, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*. 2019;394(10194):249-60.
4. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*. 2007 Mar 1;356(9):911-20.
5. Tonetti MS, Van Dyke TE, Working group 1 of the joint EFPAAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the

Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*. 2013 Apr;40(Suppl 14):S24-9.

6. 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 cardiovascular disease. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):190-201.

7. Sanz M, D'Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Heart J Suppl*. 2010 Apr 1;12(suppl B):B3-12.

8. Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VEA, Abbas F, D'Aiuto F, et al. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2014 Enero;41(1):70-9.

9. Xu S, Song M, Xiong Y, Liu X, He Y, Qin Z. The association between periodontal disease and the risk of myocardial infarction: a pooled analysis of observational studies. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017 Feb 1;17(1):50.

10. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014;15(1):30-44.

11. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Exp Mol Pathol*. 2016 Feb;100(1):220-35.

12. Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldan S, Progulske-Fox A. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Clin Periodontol*. 2013 Apr;40(Suppl 14):S30-50.

13. Marfil-Alvarez R, Mesa F, Arrebola-Moreno A, Ramirez-Hernandez JA, Magan-Fernandez A, O'Valle F, et al. Acute myocardial infarct size is related to periodontitis extent and severity. *J Dent Res*. 2014 Oct;93(10):993-8.
14. Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, et al. Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(24):11131-44.
15. Padial-Molina M, Volk SL, Rios HF. Preliminary insight into the periostin leverage during periodontal tissue healing. *J Clin Periodontol*. 2015;42(8):764-72.
16. Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, et al. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials*. 2012 Jan;33(1):137-45.
17. Park CH, Rios HF, Taut AD, Padial-Molina M, Flanagan CL, Pilipchuk SP, et al. Image-based, fiber guiding scaffolds: a platform for regenerating tissue interfaces. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Jul;20(7):533-42.
18. Rosselli-Murai LK, Almeida LO, Zagni C, Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Volk SL, et al. Periostin responds to mechanical stress and tension by activating the MTOR signaling pathway. *PloS One*. 2013;8(12):e83580.
19. Padial-Molina M, Volk SL, Rios HF. Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor α and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. *J Periodontal Res*. 2014 Jun;49(3):405-14.
20. Padial-Molina M, Volk SL, Rodriguez JC, Marchesan JT, Galindo-Moreno P, Rios HF. Tumor necrosis factor- α and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 2013 May;84(5):694-703.

21. Padial-Molina M, Volk SL, Taut AD, Giannobile WV, Rios HF. Periostin is down-regulated during periodontal inflammation. *J Dent Res.* 2012 Nov;91(11):1078-84.
22. Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):453-65.
23. Yang L, Guo T, Chen Y, Bian K. The Multiple Roles of Periostin in Non-Neoplastic Disease. *Cells.* 2022 Dec 22;12(1):50.
24. Li Q, Liu X, Wei J. Ageing related periostin expression increase from cardiac fibroblasts promotes cardiomyocytes senescent. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Sep 26;452(3):497-502.
25. Conway SJ, Molkentin JD. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease. *Curr Genomics.* 2008 Dec;9(8):548-55.
26. Tin NT, Van Minh H, Thang DC, Phuong PTM. Serum Periostin Levels in Acute Myocardial Infarction Patients: a 3-month Follow-up Study. *Acta Inform Medica AIM J Soc Med Inform Bosnia Herzeg Cas Drustva Za Med Inform BiH.* 2023;31(3):195-9.
27. Ling L, Cheng Y, Ding L, Yang X. Association of serum periostin with cardiac function and short-term prognosis in acute myocardial infarction patients. *PLoS One.* 2014;9(2):e88755.
28. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Jun;6(6):1088-102.

29. Alesutan I, Henze LA, Boehme B, Luong TTD, Zickler D, Pieske B, et al. Periostin Augments Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via β -Catenin Signaling. *Biomolecules*. 2022 Aug 21;12(8):1157.
30. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, et al. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2292-306.
31. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Trials*. 2010;11:32.
32. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-72.
33. Saghaei M, Saghaei S. Implementation of an open-source customizable minimization program for allocation of patients to parallel groups in clinical trials. *J Biomed Sci Eng*. 2011;4:734-9.
34. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, et al. Treatment of stage I-III periodontitis–The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020 Jul;47(Suppl 22):4-60.
35. Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*. 1967;38(6):610-6.
36. Morelli T, Neiva R, Nevins ML, McGuire MK, Scheyer ET, Oh TJ, et al. Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):456-62.

37. Rezaei B, Bayani M, Anvari M, Vahed P. Evaluation of periostin levels in gingival crevicular fluid in association between coronary heart disease and chronic periodontitis. *Dent Res J*. 2021;18:46.
38. Abdolalian F, Bayani M, Afzali S, Nakhostin A, Almasi-Hashiani A. Periostin level in gingival crevicular fluid in periodontal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2023 May 12;23(1):284.
39. Balli U, Keles ZP, Avci B, Guler S, Cetinkaya BO, Keles GC. Assessment of periostin levels in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2015;50(6):707-13.
40. Aral CA, Köseoğlu S, Sağlam M, Pekbağrıyanık T, Savran L. Gingival crevicular fluid and salivary Periostin levels in non-smoker subjects with chronic and aggressive periodontitis: Periostin levels in chronic and aggressive periodontitis. *Inflammation*. 2016 Jun;39(3):986-93.
41. Sophia K, Suresh S, Sudhakar U, Abdul Cader S, Vardhini VM, Arunachalam LT, et al. Comparative Evaluation of Serum and Gingival Crevicular Fluid Periostin Levels in Periodontal Health and Disease: A Biochemical Study. *Cureus*. 2020 Mar 9;12(3):e7218.
42. Morsy SM, Ali NG. The effect of non- surgical periodontal therapy on periostin level in the gingival crevicular fluid of type II diabetic patients with periodontitis. *Egypt Dent J*. 2020 Oct 1;66(Issue 4-October (Oral Medicine, X-Ray, Oral Biology&Oral Pathology)):2261-9.
43. Jamesha FI, Maradi AP, Chithresan K, Janakiram S, Maddur PK, Rangaraju R. Comparison of gingival crevicular fluid periostin levels in healthy, chronic periodontitis, and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2018;22(6):480-6.

44. Kumaresan D, Balasundaram A, Naik VK, Appukuttan DP. Gingival crevicular fluid periostin levels in chronic periodontitis patients following nonsurgical periodontal treatment with low-level laser therapy. *Eur J Dent.* 2016 Dec;10(4):546-50.
45. Arslan R, Karsiyaka Hendek M, Kisa U, Olgun E. The effect of non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid periostin levels in patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Dis.* 2021 Sep;27(6):1478-86.
46. Schwanekamp JA, Lorts A, Vagnozzi RJ, Vanhoutte D, Molkentin JD. Deletion of Periostin Protects Against Atherosclerosis in Mice by Altering Inflammation and Extracellular Matrix Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016 Jan;36(1):60-8.
47. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2014 Apr;71(7):1279-88.
48. Landry NM, Cohen S, Dixon IMC. Periostin in cardiovascular disease and development: a tale of two distinct roles. *Basic Res Cardiol.* 2018 Jan 8;113(1):1.
49. Hong LZ, Xue Q, Shao H. Inflammatory Markers Related to Innate and Adaptive Immunity in Atherosclerosis: Implications for Disease Prediction and Prospective Therapeutics. *J Inflamm Res.* 2021 Feb 16;14:379-92.
50. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J.* 2004 Mar;45(2):183-93.
51. Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 1999 Aug;40(2):97-105.
52. de Jager SCA, Bongaerts BWC, Weber M, Kraaijeveld AO, Rousch M, Dimmeler S, et al. Chemokines CCL3/MIP1 α , CCL5/RANTES and CCL18/PARC

are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PloS One*. 2012;7(9):e45804.

53. Widén C, Holmer H, Coleman M, Tudor M, Ohlsson O, Sättlin S, et al. Systemic inflammatory impact of periodontitis on acute coronary syndrome. *J Clin Periodontol*. 2016 Sep;43(9):713-9.

54. Polizzotti BD, Arab S, Kuhn B. Intrapericardial delivery of gelfoam enables the targeted delivery of Periostin peptide after myocardial infarction by inducing fibrin clot formation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36788.

55. Wang F, Yang C, Song Y, Jiang Y, Ding Z. Periostin gene polymorphisms, protein levels and risk of incident coronary artery disease. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):359-67.

56. Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, et al. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 2014 May;63(5):373-8.

57. Cheng CW, Wang CH, Lee JF, Kuo LT, Cherng WJ. Levels of blood periostin decrease after acute myocardial infarction and are negatively associated with ventricular function after 3 months. *J Investig Med*. 2012 Feb;60(2):523-8.

58. He X, Bao Y, Shen Y, Wang E, Hong W, Ke S, et al. Longitudinal evaluation of serum periostin levels in patients after large-artery atherosclerotic stroke: A prospective observational study. *Sci Rep*. 2018 Aug 6;8(1):11729.

59. Hu Y, Wang X, Ding F, Liu C, Wang S, Feng T, et al. Periostin renders cardiomyocytes vulnerable to acute myocardial infarction via pro-apoptosis. *ESC Heart Fail*. 2022 Apr;9(2):977-87.

60. Gil H, Goldshtein M, Etzion S, Elyagon S, Hadad U, Etzion Y, et al. Defining the timeline of periostin upregulation in cardiac fibrosis following acute myocardial infarction in mice. *Sci Rep*. 2022 Dec 18;12(1):21863.

61. Hixson JE, Shimmin LC, Montasser ME, Kim DK, Zhong Y, Ibarguen H, et al. Common variants in the periostin gene influence development of atherosclerosis in young persons. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1661-7.
62. Li G, Jin R, Norris RA, Zhang L, Yu S, Wu F, et al. Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α v β 3 and α v β 5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. *Atherosclerosis.* 2010 Feb;208(2):358-65.
63. Wang Z, Li G, Li M, Hu L, Hao Z, Li Q, et al. Periostin contributes to the adventitial remodeling of atherosclerosis by activating adventitial fibroblasts. *Atheroscler Plus.* 2022 Dec;50:57-64.
64. Wang F, Song Y, Jiang Y, Yang C, Ding Z. Associations among periostin gene polymorphisms, clinical parameters and heart failure: a case-control study in 1104 Chinese individuals. *J Cardiovasc Med.* 2011 Jul;12(7):469-74.
65. Hajishengallis G. Illuminating the oral microbiome and its host interactions: animal models of disease. *FEMS Microbiol Rev.* 2023;47(3):fuad018.
66. Taylor HL, Rahurkar S, Treat TJ, Thyvalikakath TP, Schleyer TK. Does Nonsurgical Periodontal Treatment Improve Systemic Health? *J Dent Res.* 2021 Mar;100(3):253-60.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Periodontal data combined or by group and time point.

	All	NST	PS	<i>P value</i> *
FGM (mm)				
Baseline	-1.31 (1.03)	-1.19 (1.28)	-1.43 (0.73)	0.243
3 months	-1.61 (1.16)	-1.24 (1.26)	-2.02 (0.93)	0.085
6 months	-1.93 (1.08)	-1.50 (1.20)	-2.41 (0.72)	0.035
<i>P value</i> **	0.006 ***	0.332	0.005 ***	
PD (mm)				
Baseline	4.25 (0.76)	3.89 (0.81)	4.61 (0.51)	0.034
3 months	2.70 (0.68)	2.72 (0.80)	2.69 (0.57)	0.918
6 months	2.48 (0.73)	2.32 (0.80)	2.65 (0.65)	0.278
<i>P value</i> **	<0.001 ****	<0.001 ****	0.002 ****	
CAL (mm)				
Baseline	5.56 (1.27)	5.08 (1.42)	6.04 (0.92)	0.101
3 months	4.32 (1.07)	3.96 (1.16)	4.70 (0.86)	0.099
6 months	4.39 (1.33)	3.78 (1.33)	5.06 (1.01)	0.035
<i>P value</i> **	<0.001 ****	0.001 ****	0.002 ****	
Mean PD change from Baseline to 3 months	1.55 (0.64)	1.17 (0.60)	1.97 (0.37)	<0.001

	All	NST	PS	P value *
Mean PD change from Baseline to 6 months	1.78 (0.61)	1.59 (0.69)	1.98 (0.46)	0.156
Mean PD change from 3 to 6 months	0.23 (0.72)	0.45 (0.75)	-0.04 (0.61)	0.203
Mean CAL change from Baseline to 3 months	1.29 (0.63)	1.18 (0.67)	1.41 (0.59)	0.468
Mean CAL change from Baseline to 6 months	0.04 (0.97)	0.48 (0.84)	-0.52 (0.86)	0.016
Mean CAL change from 3 to 6 months	1.16 (1.03)	1.57 (0.79)	0.71 (1.12)	0.053
BOP (% of sites)				
Baseline	41.25 (26.33)	39.60 (29.65)	42.90 (23.88)	0.519
3 months	5.61 (8.39)	3.88 (6.65)	7.50 (9.98)	0.512
6 months	0.78 (2.33)	1.48 (3.12)	0.00 (0.00)	0.497
P value **	<0.001 ****	<0.001 ****	<0.001 ****	
PD≥6mm (% of sites)				
Baseline	19.61 (13.14)	21.32 (15.11)	17.89 (11.30)	0.606
3 months	4.22 (5.30)	6.40 (6.20)	1.81 (2.73)	0.051

	All	NST	PS	P value *
6 months	1.85 (2.70)	1.97 (3.44)	1.71 (1.73)	0.604
P value **	<0.001 ****	<0.001 ****	0.001 ****	
CAL≥5 (% of sites)				
Baseline	56.58 (27.30)	55.83 (27.66)	57.34 (28.27)	0.898
3 months	36.94 (26.60)	33.74 (21.90)	40.46 (31.83)	0.863
6 months	34.28 (28.99)	30.88 (26.75)	38.06 (32.49)	0.905
P value **	<0.001 ****	0.002 ****	0.002 ****	

*: p value: Independent Samples Mann-Whitney U Test (NST vs. PS) at each time point.

** : p value: Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks within each groups comparing overall changes over time.

***: The comparison between baseline and 6 months was statistically significant (p=0.005) applying the Bonferroni correction for multiple tests.

****: The comparisons between baseline and 3 months and baseline and 6 months were statistically significant applying the Bonferroni correction for multiple tests

Supplementary Table 2: Wound Healing Index (n (%)) combined or by group and time point.

	7 days	2 weeks	4 weeks
All			
Complete healing	7 (31.82)	19 (86.36)	21 (95.45)
Erythema	13 (59.09)	3 (13.64)	1 (4.55)
Spontaneous bleeding	2 (9.09)	0 (0.00)	0 (0.00)
NST			
Complete healing	7 (63.64)	11 (100.00)	11 (100.00)
Erythema	4 (36.36)	0 (0.00)	0 (0.00)
Spontaneous bleeding	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
PS			
Complete healing	0 (0.00)	8 (72.73)	10 (90.91)
Erythema	9 (81.82)	3 (27.27)	1 (9.09)
Spontaneous bleeding	2 (18.18)	0 (0.00)	0 (0.00)
<i>P value</i> *	0.004	0.062	0.306

*: p value: Chi-Square test (NST vs. PS).

Supplementary Table 3: Pain measured in a 0-100 mm scale combined or by group and time point.

	All	NST	PS	<i>P value</i> *
7 days	9.14 (10.96)	11.82 (13.47)	6.45 (7.43)	0.401

2 weeks	9.41 (12.05)	10.27 (10.43)	8.55 (13.95)	0.365
4 weeks	1.41 (3.71)	1.64 (3.67)	1.18 (3.92)	0.797
<i>P value</i> **	0.035 ***	0.237	0.131	

*: p value: Independent Samples Mann-Whitney U Test (NST vs. PS) at each time point.

** : p value: Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks within each groups comparing overall changes over time.

***: No significant pairwise comparison applying the Bonferroni correction for multiple tests.

Supplementary Table 4: Blood pressure (mm Hg) and glycemia (mg/dl) over time. Data is shown as mean (SD).

	All	NST	PS	<i>P value</i> *
Systolic				
Baseline	119.64 (12.40)	119.27 (11.74)	120.83 (13.60)	0.562
7 days	115.23 (12.29)	112.73 (11.26)	117.73 (13.30)	0.365
2 weeks	118.81 (11.93)	120.50 (12.12)	117.27 (12.12)	0.468
4 weeks	115.53 (7.97)	115.45 (7.89)	115.63 (8.63)	1.000
3 months	120.75 (13.31)	118.64 (11.20)	123.33 (15.81)	0.882
6 months	119.71 (13.75)	122.22 (13.49)	116.88 (14.38)	0.139
<i>P value</i> **	0.837	0.341	0.530	
Diastolic				
Baseline	73.64 (9.90)	73.64 (10.27)	73.64 (10.02)	0.949
7 days	68.41 (9.68)	66.82 (11.02)	70.00 (8.37)	0.699
2 weeks	68.57 (7.44)	70.50 (7.98)	66.82 (6.81)	0.387
4 weeks	68.95 (6.36)	69.09 (7.69)	68.75 (4.43)	1.000
3 months	69.00 (7.36)	69.09 (7.01)	68.89 (8.21)	1.000
6 months	72.65 (11.34)	75.00 (15.21)	70.00 (3.78)	0.481

<i>P value</i> **	0.641	0.994	0.254	
Glycemia				
Baseline	137.68 (53.38)	139.64 (50.21)	135.73 (58.77)	0.898
7 days	127.19 (29.33)	131.73 (34.18)	122.20 (23.68)	0.557
2 weeks	127.62 (50.69)	125.70 (54.52)	129.36 (49.55)	0.654
4 weeks	123.15 (29.11)	116.55 (22.85)	131.22 (35.01)	0.295
3 months	133.55 (48.10)	133.10 (56.60)	134.00 (43.17)	0.631
6 months	122.00 (44.68)	127.00 (55.43)	116.38 (31.35)	0.888
<i>P value</i> **	0.737	0.700	0.845	

*: p value: Independent Samples Mann-Whitney U Test (NST vs. PS) at each time point.

** : p value: Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks within each groups comparing overall changes over time.

Supplementary Table 5: Markers in gingival crevicular fluid, listed alphabetically. All values represent mean (SD). Units are specified for each molecule.

	All	NST	PS	<i>P value</i> *
CRP (ng/ml)				
Baseline	14.18 (38.95)	7.17 (13.28)	20.49 (52.76)	0.720
7 days	4.66 (8.4)	5.56 (11.67)	3.92 (4.87)	0.503
2 weeks	6.05 (12.15)	6.2 (14.85)	5.94 (10.19)	0.766
4 weeks	5.82 (17.13)	9.73 (24.66)	2.29 (4.08)	0.315
3 months	17.47 (33.38)	21.82 (40.38)	13.12 (26.72)	0.721
6 months	4.13 (5.54)	5.65 (6.64)	2.62 (4.25)	0.589
<i>P value</i> **	0.696	0.862	0.285	
IFN-γ (pg/ml)				
Baseline	0.56 (0.53)	0.49 (0.41)	0.64 (0.65)	0.730
7 days	0.51 (0.36)	0.52 (0.35)	0.51 (0.38)	0.813
2 weeks	0.47 (0.32)	0.48 (0.21)	0.46 (0.38)	0.713
4 weeks	0.5 (0.29)	0.61 (0.36)	0.42 (0.22)	0.174
3 months	0.55 (0.36)	0.49 (0.4)	0.62 (0.33)	0.442
6 months	0.43 (0.17)	0.38 (0.19)	0.48 (0.15)	0.421
<i>P value</i> **	0.472	0.416	0.819	
IL-1β (pg/ml)				
Baseline	417.15 (352.48)	401.58 (314.94)	429.90 (395.36)	0.766

	All	NST	PS	P value *
7 days	219.88 (334.13)	466.81 (444.63)	62.75 (36.46)	0.044
2 weeks	146.33 (237.3)	270.48 (298.2)	59.42 (142.99)	0.133
4 weeks	336.22 (440.79)	490.03 (550.83)	182.41 (249.74)	0.456
3 months	447.96 (498.95)	451.36 (550.63)	444.93 (482.27)	0.963
6 months	192.65 (260.04)	247.64 (363.29)	146.82 (155.28)	1.000
P value **	0.020 ***	0.221	0.079	
IL-10 (pg/ml)				
Baseline	6.35 (7.78)	5.02 (2.52)	7.44 (10.35)	0.370
7 days	7.66 (4.75)	7.81 (4.89)	7.56 (4.88)	1.000
2 weeks	6.38 (8.17)	4.25 (5.38)	8.12 (9.82)	0.295
4 weeks	4.24 (3.60)	4.10 (3.40)	4.36 (3.95)	0.780
3 months	8.25 (14.06)	6.69 (5.87)	9.64 (19.00)	0.606
6 months	5.75 (9.78)	8.70 (13.55)	2.80 (2.40)	0.485
P value **	0.179	0.302	0.409	
MIP-1α (pg/ml)				
Baseline	12.29 (11.91)	11.68 (13.66)	12.74 (11.14)	0.968
7 days	21.93 (16.46)	17.46 (14.00)	25.59 (18.04)	0.331
2 weeks	28.39 (51.61)	14.32 (12.05)	38.23 (66.15)	0.962
4 weeks	9.68 (7.45)	10.89 (8.15)	8.71 (7.13)	0.573
3 months	14.19 (13.76)	18.24 (17.36)	10.59 (9.16)	0.541
6 months	15.79 (17.14)	20.72 (20.65)	8.41 (7.04)	0.352

	All	NST	PS	P value *
P value **	0.484	0.366	0.936	
Periostin (ng/ml)				
Baseline	0.48 (0.30)	0.47 (0.28)	0.49 (0.34)	1.000
7 days	1.96 (2.80)	0.50 (0.38)	3.16 (3.36)	0.010
2 weeks	4.48 (5.59)	1.40 (2.12)	6.99 (6.36)	0.007
4 weeks	2.89 (3.87)	0.6 (0.52)	4.72 (4.44)	<0.001
3 months	1.25 (1.52)	1.49 (2.18)	1.04 (0.61)	0.606
6 months	0.85 (0.74)	0.97 (0.94)	0.73 (0.53)	0.818
P value **	0.605	0.716	0.019 ****	
TNF-α (pg/ml)				
Baseline	5.16 (4.74)	5.00 (5.17)	5.28 (4.66)	0.545
7 days	5.82 (5.16)	6.04 (6.39)	5.69 (4.71)	0.660
2 weeks	10.29 (15.80)	9.71 (10.76)	10.75 (19.51)	0.918
4 weeks	6.24 (4.26)	8.96 (4.71)	4.53 (3.12)	0.127
3 months	6.11 (5.54)	6.41 (6.30)	5.84 (5.14)	0.963
6 months	5.04 (6.72)	8.39 (9.21)	2.24 (1.30)	0.429
P value **	0.332	0.749	0.235	

*: p value: Independent Samples Mann-Whitney U Test (NST vs. PS) at each time point.

** : p value: Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks within each groups comparing overall changes over time.



***: Statistically significant comparison between baseline and 2 weeks ($p=0.006$, Bonferroni correction for multiple tests).

****: No significant pairwise comparison applying the Bonferroni correction for multiple tests.

Supplementary Table 6: Markers in serum, listed alphabetically. All values represent mean (SD). Units are specified for each molecule.

	All	NST	PS	<i>P value</i> *
CRP (µg/ml)				
Baseline	59.09 (76.93)	90.20 (102.82)	31.09 (24.45)	0.447
2 weeks	77.51 (171.64)	128.15 (255.68)	37.00 (26.43)	0.696
3 months	57.77 (94.08)	90.47 (131.12)	29.16 (30.99)	0.463
6 months	116.98 (269.91)	173.64 (386.61)	60.31 (55.74)	0.394
<i>P value</i> **	0.696	0.960	0.392	
Fibrinogen (µg/ml)				
Baseline	26.13 (20.16)	26.02 (18.96)	26.23 (22.21)	1.000
2 weeks	18.70 (9.94)	19.09 (8.91)	18.40 (11.16)	0.633
3 months	17.15 (7.66)	18.73 (5.93)	15.78 (9.09)	0.336
6 months	32.64 (36.09)	30.57 (19.68)	34.72 (49.68)	0.394
<i>P value</i> **	0.241	0.165	0.706	
IFN-γ (pg/ml)				
Baseline	4.16 (3.01)	4.36 (2.76)	3.95 (3.45)	0.535
2 weeks	5.15 (3.96)	5.60 (3.57)	4.81 (4.45)	0.414
3 months	4.57 (3.07)	5.37 (2.98)	3.90 (3.24)	0.329
6 months	4.36 (2.72)	5.17 (3.55)	3.56 (1.72)	0.686
<i>P value</i> **	0.533	0.801	0.567	
IL-1β (pg/ml)				

	All	NST	PS	P value *
Baseline	0.54 (0.31)	0.48 (0.30)	0.59 (0.33)	0.315
2 weeks	0.49 (0.38)	0.54 (0.46)	0.45 (0.32)	0.515
3 months	0.60 (0.51)	0.42 (0.23)	0.76 (0.64)	0.281
6 months	0.52 (0.29)	0.45 (0.08)	0.58 (0.42)	0.818
P value **	0.543	0.159	0.268	
IL-6 (pg/ml)				
Baseline	2.23 (2.66)	2.12 (1.81)	2.34 (3.36)	0.277
2 weeks	1.83 (1.64)	1.57 (0.92)	2.09 (2.18)	0.959
3 months	2.06 (2.74)	1.84 (3.71)	2.31 (1.20)	0.082
6 months	1.65 (1.94)	1.88 (2.59)	1.42 (1.25)	0.841
P value **	0.392	0.818	0.334	
IL-10 /pg/ml)				
Baseline	10.27 (13.34)	6.58 (2.91)	13.6 (17.95)	0.497
2 weeks	10.74 (10.92)	5.86 (1.77)	14.65 (13.60)	0.043
3 months	8.36 (8.03)	6.35 (4.09)	10.13 (10.35)	0.397
6 months	9.5 (7.51)	8.57 (4.57)	10.43 (10.06)	0.699
P value **	0.451	0.682	0.025	
L-Selectin (µg/ml)				
Baseline	5.94 (3.66)	6.76 (4.29)	5.21 (3.02)	0.447
2 weeks	4.96 (2.23)	5.14 (2.54)	4.82 (2.08)	0.696
3 months	5.16 (1.96)	5.58 (2.20)	4.79 (1.79)	0.694

	All	NST	PS	P value *
6 months	9.81 (12.86)	7.50 (4.94)	12.12 (18.08)	0.589
P value **	0.266	0.112	0.457	
MIP-1α (pg/ml)				
Baseline	5.52 (4.57)	3.84 (3.93)	7.03 (4.76)	0.095
2 weeks	3.00 (2.09)	2.53 (1.15)	3.38 (2.62)	0.696
3 months	4.45 (4.87)	4.78 (5.84)	4.17 (4.24)	0.955
6 months	2.98 (2.29)	2.95 (2.87)	3.02 (1.80)	0.589
P value **	0.675	0.852	0.241	
Periostin (ng/ml)				
Baseline	94.66 (20.12)	95.16 (23.3)	94.22 (18.07)	0.661
2 weeks	91.93 (25.11)	87.90 (27.11)	95.16 (24.35)	0.515
3 months	90.12 (20.66)	87.23 (20.17)	92.66 (22.12)	0.694
6 months	95.56 (28.62)	93.61 (35.7)	97.5 (22.76)	0.818
P value **	0.806	0.691	0.535	
TNF-α (pg/ml)				
Baseline	3.71 (2.03)	2.34 (1.97)	4.81 (1.32)	0.006
2 weeks	3.45 (1.50)	3.07 (1.27)	3.79 (1.67)	0.423
3 months	3.15 (1.71)	2.27 (0.94)	3.93 (1.90)	0.054
6 months	2.78 (1.69)	2.35 (0.74)	3.14 (2.21)	0.792
P value **	0.856	0.308	0.266	
Von Willebrand Factor (μg/ml)				

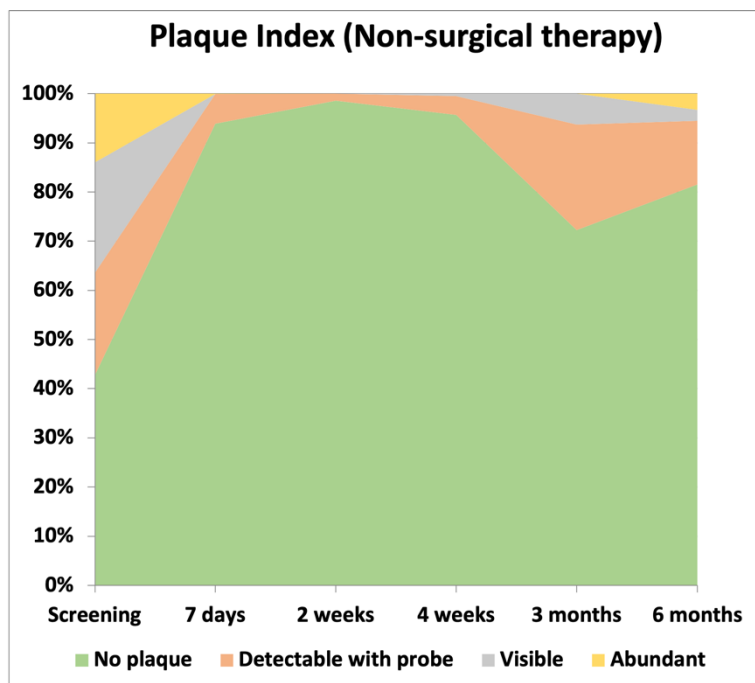
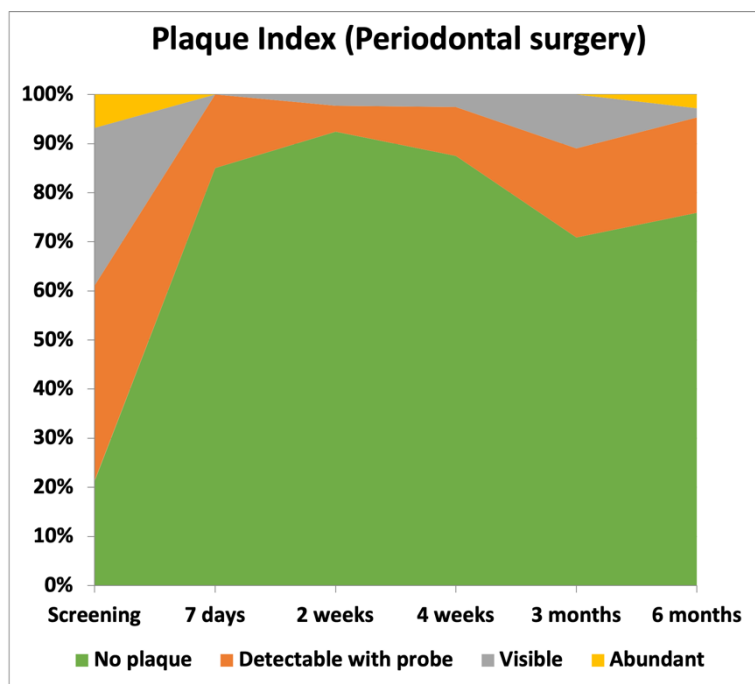
	All	NST	PS	P value *
Baseline	107.7 (53.23)	126.39 (55.84)	90.88 (47.23)	0.182
2 weeks	92.69 (44.09)	109.63 (53.28)	79.15 (31.72)	0.203
3 months	93.37 (42.06)	106.86 (41.94)	81.56 (41.09)	0.232
6 months	148.58 (122.8)	136.92 (66.1)	160.25 (168.75)	0.699
P value **	0.069	0.127	0.204	

*: p value: Independent Samples Mann-Whitney U Test (NST vs. PS) at each time point.

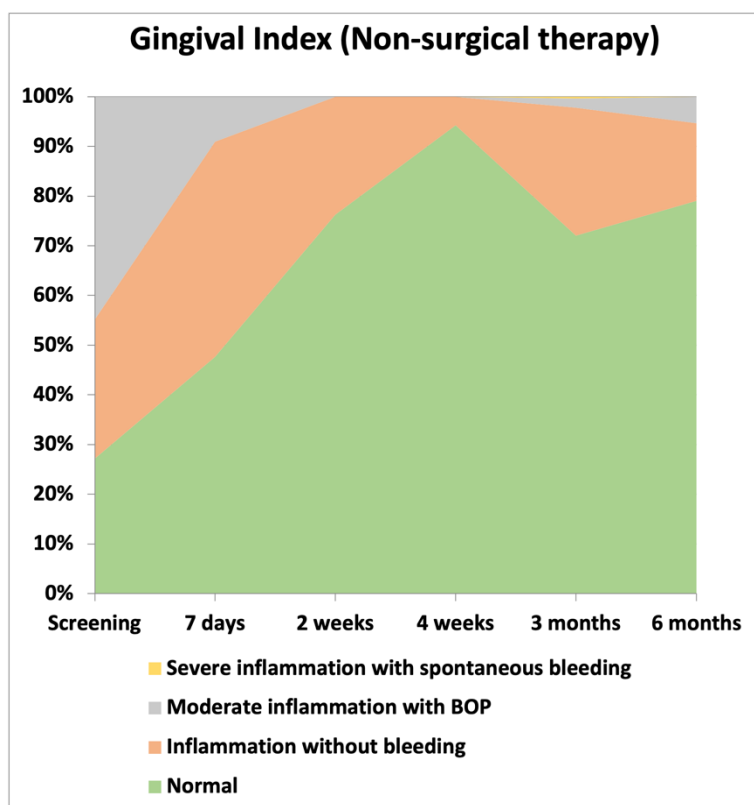
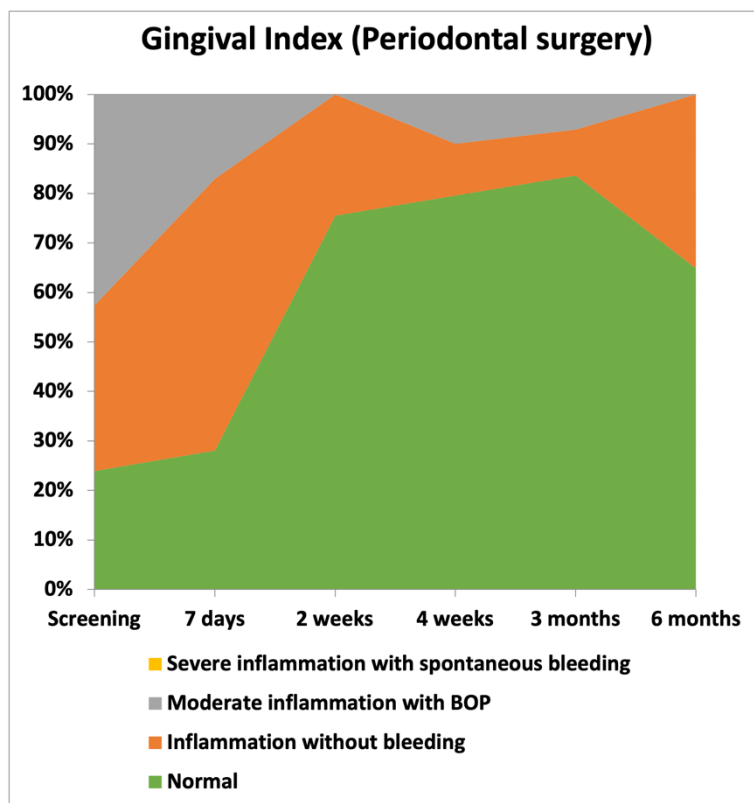
** : p value: Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks within each groups comparing overall changes over time.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

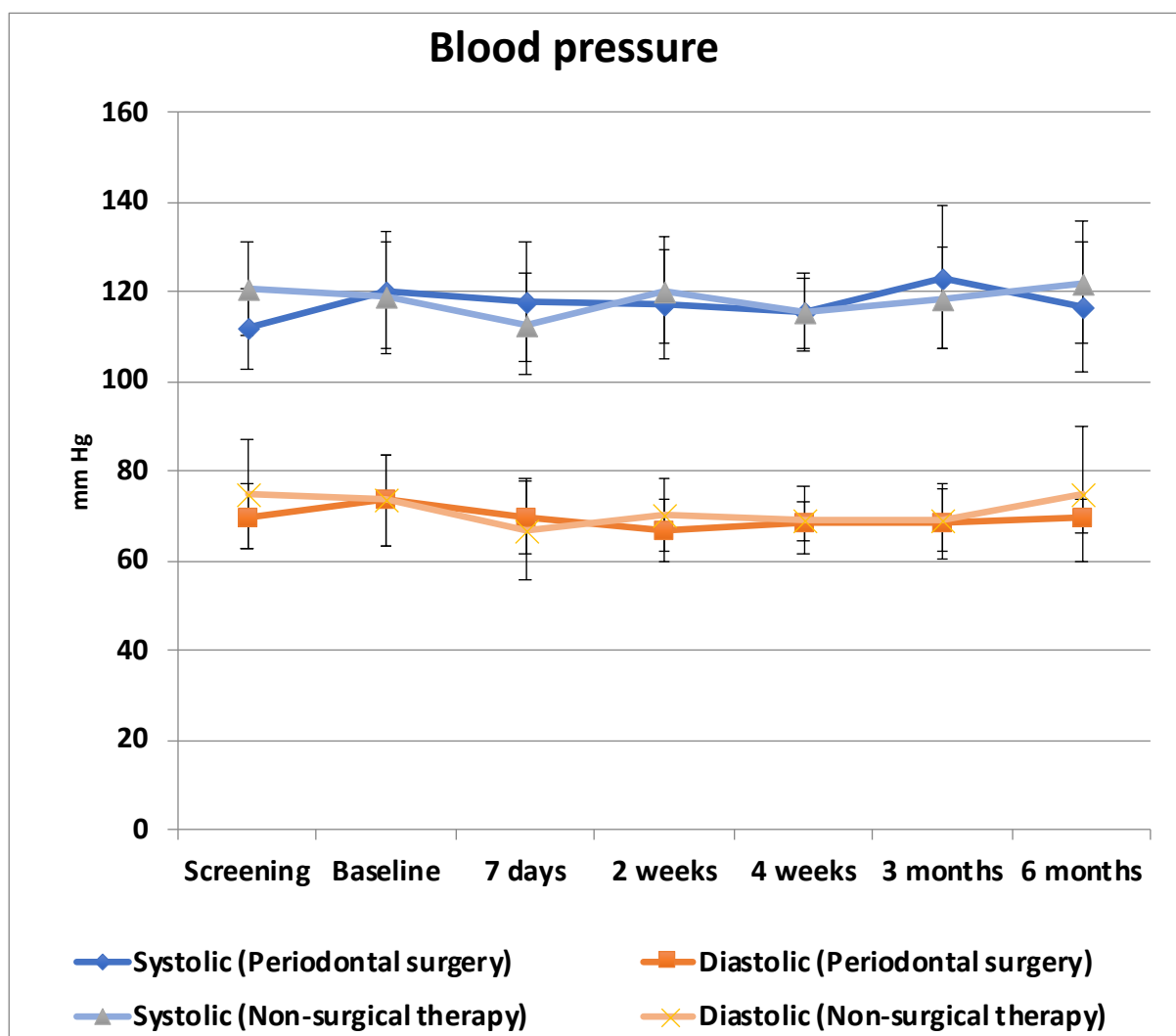
Supplementary Figure 1: Plaque index overtime in each group (Periodontal surgery vs. Non-surgical therapy).



Supplementary Figure 2: Gingival index overtime in each group (Periodontal surgery vs. Non-surgical therapy).



Supplementary Figure 3: Blood pressure over time by treatment group. No differences were observed neither between groups nor overtime.



Supplementary Figure 4: Glycemia over time by treatment group. No differences were observed neither between groups nor overtime.

